

Université de Montréal

BP1, un gène homéotique *distal-less* et son rôle  
dans l'érythropoïèse murine définitive.

Par  
Mélissa Beaudoin

Programmes de biologie moléculaire  
Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de maîtrise  
en biologie moléculaire

Août, 2003

©, Mélissa Beaudoin, 2003



QH

506

U54

2004

V.005

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

BP1, un gène homéotique *distal-less* et son rôle  
dans l'érythropoïèse murine définitive.

présenté par :

Mélissa Beaudoin

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Éric Milot, Ph. D.  
président-rapporteur

Dr Marie Trudel, D. Sc.  
directrice de recherche

Dr Christian Deschepper, Ph. D.  
membre du jury

## Résumé français

BP1, une protéine homéotique est exprimée durant l'hématopoïèse dans la lignée érythroïde et *in vitro* agit comme répresseur du gène adulte de  $\beta$ -globine. Afin de déterminer le rôle de la protéine BP1 humaine *in vivo*, nous avons généré des souris transgéniques et des cellules embryonnaires souches (ES) qui expriment BP1 au stade adulte grâce aux séquences régulatrices du gène de  $\beta$ -globine (LCR $\beta$ BP1 $\beta$ ). Des 121 souris que nous avons produites, une seule s'est avérée positive mais était très mosaïque, ce qui a suggéré une létalité *in utero*. Cette fondatrice présentait une splénomégalie et une érythropoïèse extramedullaire. L'expression de BP1 durant la différenciation des cellules ES en corps embryonnaires montre une corrélation inverse avec l'expression du gène adulte de  $\beta$ -globine. Durant la différenciation en précurseurs hématopoïétiques, l'expression de BP1 diminue l'expression du gène  $\beta$ majeur dans les précurseurs érythroïdes primitifs et définitifs. Cependant, l'expérience nous indique une diminution significative du pourcentage des colonies érythroïdes définitives seulement. D'autre part, nous avons généré des souris transgéniques avec une construction dépourvue du LCR ( $\beta$ BP1 $\beta$ ) et 12 fondatrices BP1 ont été obtenues générant des lignées transgéniques. Plusieurs lignées indépendantes expriment BP1 à différents niveaux et démontrent des défauts dans les paramètres hématologiques, suggérant un rôle de BP1 dans l'érythropoïèse murine. Ces études montrent que BP1 régule négativement le gène murin adulte de  $\beta$ -globin et la différenciation érythroïde définitive.

**Mots clés :** Hémoglobine, souris transgéniques, cellules souches embryonnaires, répresseur, érythropoïèse.

## Résumé Anglais

BP1, a human homeotic protein, is expressed during hematopoiesis in the erythroid lineage and *in vitro* repressed the adult  $\beta$ -globin gene. To determine the *in vivo* role of BP1 in erythropoiesis, we have undertaken two complementary approaches, using enforced BP1 expression with regulator element of  $\beta$ -globin (LCR $\beta$ BP1 $\beta$ ), in both transgenic mice and embryonic stem cells. Despite several attempts, only one transgenic BP1 founder mouse among 121 mice was obtained, suggesting embryonic lethality. This mouse expressed BP1 and presumably survived due to transgene mosaicism because the transgene could not be transmitted. The mouse displayed splenomegaly and extramedullary erythropoiesis. BP1 expression in primary ES cells differentiation showed an inverse correlation with adult  $\beta$ -globin expression. In secondary differentiation, BP1 expression reduced  $\beta$ major gene expression in both primitive and definitive erythroid cells whereas it impaired only the definitive erythroid cell differentiation. Also, we have generated transgenic mice without the LCR ( $\beta$ BP1 $\beta$ ) and we have obtained 12 transgenic founders and generated transgenic lines. Some lines who expressed BP1 show hematological disorder, suggesting a role for BP1 in mouse erythropoiesis. These studies indicate that BP1 can negatively modulate adult  $\beta$ -globin gene expression and definitive erythroid cell differentiation.

**Key words :** hemoglobin, transgenic mice, embryonic stem cells, repressor, erythropoiesis.

## Table des matières

Résumé Français.....	IV
Résumé Anglais.....	V
Table des matières.....	VI
Table des tableaux.....	IX
Table des figures.....	X
Liste des abréviations.....	XI
Dédicace.....	XIV
Remerciements.....	XV
<b>CHAPITRE 1 .....</b>	<b>1</b>
<i>1.1 Le système hématopoïétique.....</i>	<i>1</i>
1.1.1 Ontogénie.....	1
1.1.2 Caractérisation des précurseurs de la moelle osseuse .....	5
1.1.3 Les cellules matures du système hématopoïétique.....	8
1.1.4 Différenciation hématopoïétique : système <i>in vitro</i> .....	10
<i>1.2 Le locus de <math>\beta</math>-globine .....</i>	<i>12</i>
1.2.1 Arrangement du locus humain et son expression développementale.....	12
1.2.2 Arrangement du locus murin et son expression développementale .....	14
1.2.3 Études de la régulation du locus de $\beta$ -globine humain <i>in vivo</i> .....	15
1.2.4 Régulation individuelle de chaque gène du locus de $\beta$ -globine humain .....	17
1.2.5 Facteur transcriptionnel GATA-1.....	29
<i>1.3 BP1 (beta-protein 1).....</i>	<i>35</i>
1.3.1 Identification de BP1 .....	35
1.3.2 Les membres de la famille Distal-less.....	38
1.3.3 Les complexes HOX et leur rôle dans l'hématopoïèse .....	43
<i>1.4 Objectif de mon mémoire.....</i>	<i>45</i>

<b>CHAPITRE 2</b>	<b>46</b>
2.1 <i>Construction plasmidique</i>	46
2.1.1 Enzymes de restriction et de modification	46
2.1.2 Isolement de fragments d'ADN	47
2.1.3 Réaction de polymérase en chaîne	47
2.1.4 Ligation d'ADN	48
2.1.5 Transformation	49
2.1.6 Minipréparation (lyse alcaline)	49
2.1.7 Séquençage	50
2.1.8 Maxipréparation (gradient de CICs)	52
2.1.9 Constructions réalisées	54
2.2 <i>Obtention des lignées de souris transgéniques</i>	56
2.2.1 Préparation des fragments à microinjecter	56
2.2.2 Microinjection	58
2.2.3 Établissement des lignées transgéniques	59
2.3 <i>Manipulation des cellules souches embryonnaires</i>	60
2.3.1 Culture des cellules souches embryonnaires (ES)	60
2.3.2 Production des cytokines	60
2.3.3 Électroporation des cellules ES et sélection des transfectants stables	63
2.3.4 Congélation et décongélation des cellules	63
2.3.5 Différenciation des cellules ES en corps embryonnaires	64
2.3.6 Différenciation des corps embryonnaires en colonies hématopoïétiques	65
2.4 <i>Étude de la structure du transgène</i>	65
2.4.1 Extraction d'ADN	65
2.4.2 Transfert Southern	66
2.5 <i>Vérification de l'expression</i>	68
2.5.1 Extraction de l'ARN (Guanidium et Trizol)	68
2.5.2 RT-PCR	70
2.5.3 Protection à la RNase	74
2.6 <i>Pathologie</i>	75
2.6.1 Prélèvement des organes	75



2.6.2 Fixation.....	75
<b>CHAPITRE 3.....</b>	<b>76</b>
3.1 <i>Détermination du rôle de BP1 dans l'érythropoïèse.....</i>	76
3.1.1 Obtention de souris transgéniques.....	77
3.1.2 Analyse de l'expression.....	79
3.1.3 Pathologie.....	81
3.2 <i>Élucidation du rôle de BP1 humain dans l'érythropoïèse murine in vitro .....</i>	84
3.2.1 Constructions.....	84
3.2.2 Génération des transfectants stables.....	85
3.2.3 Analyse de l'intégrité du transgène des transfectants stables par Southern .	86
3.2.4 Différenciation et expression.....	87
3.3 <i>Élucidation du rôle de BP1 humain dans l'érythropoïèse murine in vivo .....</i>	95
3.3.1 Génération de souris transgéniques .....	95
3.3.2 Criblage des souris pour l'intégrité du transgène par transfert Southern.....	96
3.3.3 Analyse de l'expression du transgène $\beta$ BP1 $\beta$ .....	98
3.3.4 Analyse des paramètres hématologiques.....	101
<b>CHAPITRE 4.....</b>	<b>104</b>
4.1 <i>Discussion.....</i>	104
4.1.1 Rôle de l'expression de BP1 au stade adulte dans l'érythropoïèse .....	104
4.1.2 Implication du rôle de BP1 humain dans l'érythropoïèse murine <i>in vitro</i> .	107
4.1.3 Implication du rôle de BP1 humain dans l'érythropoïèse murine <i>in vivo</i> ..	113
4.2 <i>Conclusion.....</i>	117
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>119</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau I.</b> T <sub>m</sub> °C et tampons utilisés pour les différentes amplifications spécifiques à chaque paire d'amorces.....	73
<b>Tableau II.</b> Résumé de la microinjection du transgène LCR $\beta$ BP1 $\beta$ .....	78
<b>Tableau III.</b> Hémoglobinisation des corps embryonnaires.....	90
<b>Tableau IV.</b> Caractérisation des fondatrices portant le transgène $\beta$ BP1 $\beta$ .....	98
<b>Tableau V.</b> Paramètres hématologiques des lignées $\beta$ BP1 $\beta$ .....	102
<b>Tableau VI.</b> Paramètres hématologiques de la lignée $\beta$ BP1 $\beta$ -43.....	103

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Schéma de l'origine du système hématopoïétique et des vaisseaux sanguins.....	2
<b>Figure 2.</b> Le système hématopoïétique et ces cellules matures.....	9
<b>Figure 3.</b> Schéma des protéines liant la région promotrice du gène $\epsilon$ .....	19
<b>Figure 4.</b> Schéma des protéines liant la région promotrice des gènes $\gamma$ .....	22
<b>Figure 5.</b> Schéma des protéines liant la région promotrice du gène adulte $\beta$ .....	26
<b>Figure 6.</b> Schéma des constructions finales utilisées pour la microinjection et pour la production de la sonde pour la protection à la RNase.....	56
<b>Figure 7.</b> Séquence des amorces sens et antisens pour l'analyse de l'expression des transgènes LCR $\beta$ BP1 $\beta$ et $\beta$ BP1 $\beta$ .....	72
<b>Figure 8.</b> Southern LCR $\beta$ BP1 $\beta$ -32.....	78
<b>Figure 9.</b> Protection à la RNase sur la fondatrice LCR $\beta$ BP1 $\beta$ -32.....	80
<b>Figure 10.</b> Analyse de l'expression du transgène LCR $\beta$ BP1 $\beta$ .....	81
<b>Figure 11a et 11b.</b> Coupe histologique de la rate de LCR $\beta$ BP1 $\beta$ -32.....	83
<b>Figure 12.</b> Schéma de la construction contrôle p $\beta$ SH $\beta$ .....	85
<b>Figure 13.</b> Analyse d'un transfert Southern des transfectants stables.....	87
<b>Figure 14.</b> Analyse de l'expression du transgène LCR $\beta$ BP1 $\beta$ par PCR.....	89
<b>Figure 15.</b> Analyse de l'expression du transgène LCR $\beta$ BP1 $\beta$ par PCR.....	92
<b>Figure 16.</b> Graphique du nombre de colonies érythroïdes primitifs et morphologie.....	93
<b>Figure 17.</b> Graphique du nombre de colonies érythroïdes définitifs et morphologie.....	94
<b>Figure 18.</b> Schéma de la construction pGEM5- $\beta$ BP1 $\beta$ $\Delta$ NCO1 utilisée pour la microinjection.....	96
<b>Figure 19.</b> Analyse d'un transfert Southern des fondatrices $\beta$ BP1 $\beta$ .....	97
<b>Figure 20.</b> Analyse de l'expression du transgène $\beta$ BP1 $\beta$ .....	100

## Liste des abréviations

A : adénine  
ADN : acide déoxyribonucléique  
ADNc : acide déoxyribonucléique complémentaire  
ARN : acide ribonucléique  
ARNm : acide ribonucléique messenger  
ATP : adénosine 5'-triphosphate  
BP1 : bêta-protéine 1  
BrEt : bromure d'éthidium  
BSA : albumine de sérum bovin  
C : cytosine  
COS : cellules de rein  
ClCs : chlorure de césium  
Ctr : contrôle  
DEPC : diéthylpolycarbonate  
DMEM : milieu Eagle modifié selon Dulbecco  
DMSO : diméthylsulphoxide  
DNase : désoxyribonucléase  
dNTPs : désoxyribonucléotides triphosphates (N : A,C, G ou T)  
DTT : dithiothréitol  
EBs : corps embryonnaires  
EDTA : éthylènediaminetetra- acide acétique  
Epo : érythropoïétine  
ÉryD : colonie érythroïde définitive  
ÉryP : colonie érythroïde primitive  
ES : cellules souches embryonnaires  
Ex : exon  
FBS : sérum de bovin foetal  
FSH : hormone de stimulation des follicules

G : guanine  
GuHCl : guanidium HCl  
HCT : hématocrite  
HGB : quantité d'hémoglobine  
Il-3 : interleukine-3  
IMDM : milieu Dulbecco modifié selon Iscove  
Kb : kilobases  
LB : milieu Luria-Bertani  
LCR : région de contrôle du locus  
LH : hormone lutéinisante  
LIF : facteur inhibant les leucémies  
MeC : méthylcellulose  
micro : cellule microcytique  
M-MLV : moloney virus murin leucémie  
MTG : monothioglycérol  
Nb : nombre  
pb : paires de bases  
PBS : tampon phosphate salin  
PCR : réaction de polymérisation en chaîne  
PDW : distribution des plaquettes  
PFHM-II : milieu d'hybridome sans protéines  
Pipes : piperazine-N,N'-bis(2-acide éthanosulfonique)  
PLT : plaquette  
Poly A : site de polyadénylation  
Pr : promoteur  
RBC : globule rouge  
Rétic : réticulocyte  
RNase : ribonucléase  
RNasin : inhibiteur de RNase  
rpm : révolution par minute  
RPMI : milieu RPMI 1640

RT-PCR : transcription inverse- réaction de polymérisation en chaîne

SCF : facteur des cellules souches

SDS : sodium dodécylsulfate

SSC : solution de sodium et de sodium citrate

T : thymine

TAE : tampon de Tris, acide acétique et EDTA

TBE : tampon de Tris, borate et EDTA

TdT : transférase terminale déoxynucléotidyl

TE : solution de Tris et EDTA

tg : transgénique

À toi papa,  
Puisses-tu être fière de ta fille  
même de là-haut,  
toi qui aurait tant aimé lire ce mémoire.  
À toi ma volonté,  
mon amour de la vie.

À toi maman,  
pour ton soutien,  
ton amour,  
pour TOI.

À Anne Renée et Simon,  
mes sources d'inspiration,  
mes forces.

À mes grands-parents, oncles, tantes, cousins, cousines, belle-famille,  
mes épaules,  
mon bonheur.

À Dominique et Charlotte,  
mes rayons de soleil.

À toi, mon amour,  
Simon,  
pour tout,  
Je t'aime.

Avec amour et tendresse.

## Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier Dr Marie Trudel, ma directrice de maîtrise, qui a dirigé ce travail de recherche. Je la remercie pour ce qu'elle m'a appris durant ma maîtrise. Sa compétence dans le domaine de la génétique moléculaire et du développement m'a permis de parfaire mes connaissances en biologie moléculaire.

Je me dois aussi de remercier notre collaboratrice, Dr Patricia Berg, qui nous a généreusement fourni l'ADNc de BP1 et prodigué idées et conseils.

J'aimerais aussi remercier l'ensemble des personnes que j'ai cotoyé à l'IRCM, et plus particulièrement Mesdames Viviane Jodoin, secrétaire de biologie moléculaire et Dr Trang Hoang, responsable de biologie moléculaire. De plus, mes collègues du laboratoire, qui, en créant un environnement où il fait bon travailler, m'ont permis de réaliser ma maîtrise dans de très bonnes conditions.

Enfin, je remercie la FES-Biologie moléculaire et VWR International Inc, (via l'entremise de l'IRCM) qui m'ont octroyé des bourses.



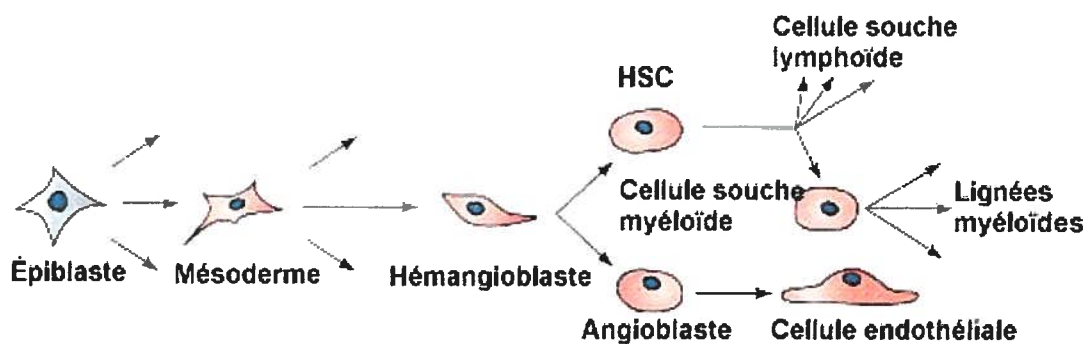
# Chapitre 1

## INTRODUCTION

### 1.1 Le système hématopoïétique

#### 1.1.1 Ontogénie

Durant le développement embryonnaire, l'hématopoïèse est le premier processus à prendre place après l'implantation du blastocyste. C'est à partir du troisième feuillet embryonnaire, soit le mésoderme que la formation des îlots sanguins est spécifiée. Les îlots sanguins contiennent deux types de cellules, la cellule souche hématopoïétique (HSC) à l'intérieur et les angioblastes : les précurseurs des vaisseaux sanguins, à l'extérieur. L'hématopoïèse primitive se définit comme étant la formation des cellules sanguines à partir de la cellule souche hématopoïétique des îlots sanguins. Au début du 20<sup>e</sup> siècle, on a proposé l'existence d'un précurseur commun, l'hémangioblaste, à la cellule souche hématopoïétique et à l'angioblaste (Sabin, 1920 ; Murray, 1932 et Wagner, 1980). Plusieurs évidences supportent l'existence de l'hémangioblaste ; premièrement, le mésoderme spécifie l'HSC et les angioblastes. Deuxièmement, les deux types cellulaires portent des marqueurs de surface communs (comme par exemple CD34, VE-cadherine). Et, troisièmement, ils expriment plusieurs gènes communs et se développent en étroite association spatiale et temporelle. L'hémangioblaste serait donc le précurseur le plus primitif ayant un profil hématopoïétique (revue par Lacaud et al., 2001). Voir figure 1.



**Figure 1.** Schéma de l'origine du système hématopoïétique et des vaisseaux sanguins. Adapté de *Developmental Biology*, 6<sup>e</sup> édition, Scott F. Gilbert.

**Légende de la figure 1 :**

Représentation schématique de la spécification mésodermique et de la différenciation vers les lignées lymphoïdes, myéloïdes et endothéliales.

Au cours du développement, l'hématopoïèse prend place dans des endroits différents. Chez l'embryon humain, l'hématopoïèse primitive débute dans les îlots sanguins du sac vitellin à partir du 18<sup>e</sup> jour de gestation alors que chez la souris, elle apparaît à 7.5 jours de gestation. Cette hématopoïèse primitive utilise l'HSC qui se différencie en érythroblastes primitifs, larges et nucléés. Ces érythroblastes primitifs synthétisent l'hémoglobine embryonnaire et la différenciation de ces derniers est aussi appelée érythropoïèse primitive. Ensuite, il y a un déplacement vers l'hématopoïèse définitive dans le foie fœtal après quatre semaines de gestation chez l'homme et à partir du 10-11<sup>e</sup> jour embryonnaire chez la souris. Cette hématopoïèse définitive produit tous les précurseurs et les cellules différenciées des lignées lymphoïdes, myéloïdes et érythroïdes à partir de l'HSC adulte (définitive). Par la suite, cette hématopoïèse définitive se déplace une dernière fois, au moment de la naissance, dans la moelle osseuse chez l'humain et dans la moelle osseuse et la rate chez la souris.

#### 1.1.1.1 Première hypothèse : une seule HSC

Le schéma général du système hématopoïétique et de ces différents sites au cours du développement a été longtemps accepté comme résultant de la migration de la HSC du sac vitellin à la moelle osseuse. Moore et Metcalf, 1970 ont montré que le système hématopoïétique dérivait seulement du sac vitellin et plusieurs auteurs (Cumano, 1993 ; Liu, 1993 ; Huang, 1993 ; Wong, 1986) ont montré l'existence des précurseurs des cellules matures des lignées myéloïdes et lymphoïdes dans le sac vitellin de même que la présence de cellules capables de repopuler le système hématopoïétique à long terme (LTR-HSC). Récemment, Palis et al., 1999, ont montré *in vitro* par des essais de formation de colonies à partir de précurseurs d'embryons murins que le sac vitellin était le seul responsable de l'érythropoïèse primitive et qu'il était la source première de précurseurs définitifs durant le développement embryonnaire.

#### 1.1.1.2 Deuxième hypothèse : deux HSC

Depuis les années 90, (outre les travaux de Palis, 1999) ce schéma est remis en question pour plusieurs raisons. Chez les oiseaux et les amphibiens, plusieurs résultats démontrent l'existence d'un autre site hématopoïétique, dérivant du mésoderme entourant l'aorte. Cet autre site, qui est intraembryonnaire, serait responsable de l'hématopoïèse définitive alors que le sac vitellin ne serait responsable que de l'hématopoïèse primitive. Bien avant ces résultats, Dieterlen-Lièvre et al., 1981, ont montré, en utilisant des chimères de poulet et de caille, que les cellules souches du sac vitellin ne contribuent pas à la formation des cellules hématopoïétiques adultes de l'animal.

Chez la souris, plusieurs auteurs ont rapporté une absence de précurseurs définitifs CFUs, colonie formant une unité dans la rate, et de LTR-HSC dans le sac vitellin au jour embryonnaire 9 et 11 (Medvinsky, 1993; Muller, 1994). Chez la souris, un site d'activité d'hématopoïèse définitive intraembryonnaire pré-foie foetal a été mis en évidence par Medvinsky et al., 1993. Ils ont montré que la région AGM (aorte-gonade-mésonephros), équivalente à la région identifiée chez les oiseaux, contient une proportion significativement plus élevée de CFUs que le sac vitellin au jour embryonnaire 9 chez la souris. En 1996, grâce à un nouveau modèle *in vitro* de cultures d'organes, ils ont montré que l'apparition des HSC s'initie de manière autonome et exclusive dans la région de l'AGM.

Nous avons donc deux modèles alternatifs de l'ontogénie du système hématopoïétique, le modèle de l'unique HSC qui migre du sac vitellin à la moelle osseuse et le modèle des deux HSC (primitive et définitive) qui dérivent du mésoderme et migre dans le sac vitellin et dans l'AGM.

#### 1.1.1.3 La cellule souche hématopoïétique

La cellule souche hématopoïétique est capable d'auto-renouvellement et est capable de se différencier en précurseurs pluripotents, donnant les lignées lymphoïdes et myéloïdes et multipotents, donnant une ou l'autre des lignées (référer à la figure 1). Un exemple de ces précurseurs multipotents est le CFUs qui donne naissance aux cellules myéloïdes mais pas aux cellules lymphoïdes. Les précurseurs multipotents vont aussi se différencier successivement pour finir par se différencier en cellules matures, composantes du sang. La différenciation progressive de cette cellule souche entraîne une diminution graduelle du potentiel prolifératif dans les précurseurs durant leur maturation.

### 1.1.2 Caractérisation des précurseurs de la moelle osseuse

Plusieurs outils ont été développés, au cours des années, afin d'étudier le système hématopoïétique, la cellule souche hématopoïétique et ses précurseurs. Au début des années 50, plusieurs auteurs ont établi l'existence des cellules souches hématopoïétiques à partir d'expériences de transplantation dans des souris irradiées à des doses létales (Ford et al., 1956; Lindsley et al., 1955; Mitchison et al., 1956; Nowell et al., 1956). La transplantation de cellules de rate protégeait contre les effets d'une irradiation létale. À ce moment, l'hypothèse que les cellules de rate du donneur colonise la rate de la souris receveur a été soulevée. C'est en 1961 que Till et McCulloch ont montré que des cellules de moelle osseuse transférées à des souris irradiées à des doses létales étaient capables de former des nodules de cellules hématopoïétiques avec un potentiel prolifératif dans la rate des souris irradiées et ce, entre 8 et 11 jours après le transfert. Avec des analyses histologiques, ils ont montré qu'en plus du pouvoir prolifératif des cellules constituant les nodules, celles-ci sont capable de se différencier. Les nodules sont aussi constitués d'érythroblastes primitifs et définitifs, de granulocytes et de mégacaryocytes. Ces nodules ont été appelés « colonie de la rate » et les cellules à leur origine sont appelées « unité formant une colonie de la rate » (CFUs), un précurseur multipotent.

En effectuant un second transfert de cellules, provenant des nodules, dans des souris irradiées, Siminovitch et al., 1963, ont montré que les CFUs étaient capable d'auto-renouvellement. Le nombre de colonies secondaires obtenu à partir de chaque nodule variait de 0 à 1 000, ce qui représente une grande

hétérogénéité de la distribution des cellules capables de former une colonie. Par leurs résultats, ils ont attribué trois caractéristiques au CFUs, soient la capacité de prolifération, d'auto-renouvellement et de différenciation. Mais, par la suite, ils ont montré que le CFUs ne peut engendrer toutes les cellules matures des lignées myéloïdes et lymphoïdes et donc, que le CFUs n'est pas la cellule souche hématopoïétique tant recherchée.

Toujours dans le but d'isoler la cellule souche hématopoïétique, à cette même époque, d'autres auteurs ont développé différentes cultures *in vitro*. En 1966, Bradley et Metcalf ont généré des colonies poussant dans l'agar sur une couche de cellules nourricières qui étaient des cellules de rein murines. Ces colonies à prédominance mononucléaire granulocytaire se développent à partir d'une suspension monocellulaire de moelle osseuse ou de rate et non à partir des cellules de ganglions ou de thymus. Ces colonies seront appelées CFUc, unité formant une colonie en culture. Le succès des cellules de rein, comme cellules nourricières, comparativement à un autre type cellulaire a été attribué, à cette époque à la production d'un environnement favorable. Par la suite, les techniques de mise en culture se sont développées grâce aux travaux de plusieurs auteurs. Iscove et al., en 1971, ont changé l'agar pour la méthyle cellulose et ont utilisé différents milieux conditionnés. En 1973, ils ont réussi à générer des colonies érythroïdes en utilisant du plasma de chèvre anémique contenant une activité stimulant les colonies érythroïdes et de l'érythropoïétine. Plus tard, en 1975, ils ont montré que l'ajout de  $\beta$ -mercaptoéthanol augmentait l'efficacité de formation de colonies érythroïdes après 2 jours de culture et que l'utilisation de fortes doses

d'érythropoïétine favorisait l'obtention d'une seconde population de colonies érythroïdes après 5 jours de culture. Ce deuxième type de colonies avait déjà été rapporté par Axelrad et al, 1974, mais en plus faible proportion et avait été caractérisé comme étant plus grosses « bursts ». Les appellations CFUe pour unité formant une colonie érythroïde et BFUe pour unité formant une « burst » érythroïde, ont vu le jour dans les années 70. Comme ces colonies contiennent principalement des cellules érythroïdes, elles ne correspondent pas à la cellule souche hématopoïétique. Le BFUe serait un précurseur érythroïde précoce alors que le CFUe serait un précurseur érythroïde plus tardif qui produira les proérythroblastes.

On sait aussi grâce aux travaux de Worton et al., 1969 que les CFUs et les CFUc sont des précurseurs différents puisqu'on ne les retrouve pas dans les mêmes fractions de la moelle osseuse. Ils ne sont pas non plus la cellule souche hématopoïétique la plus primitive car leur pouvoir de différenciation est limité à certaines lignées hématopoïétiques.

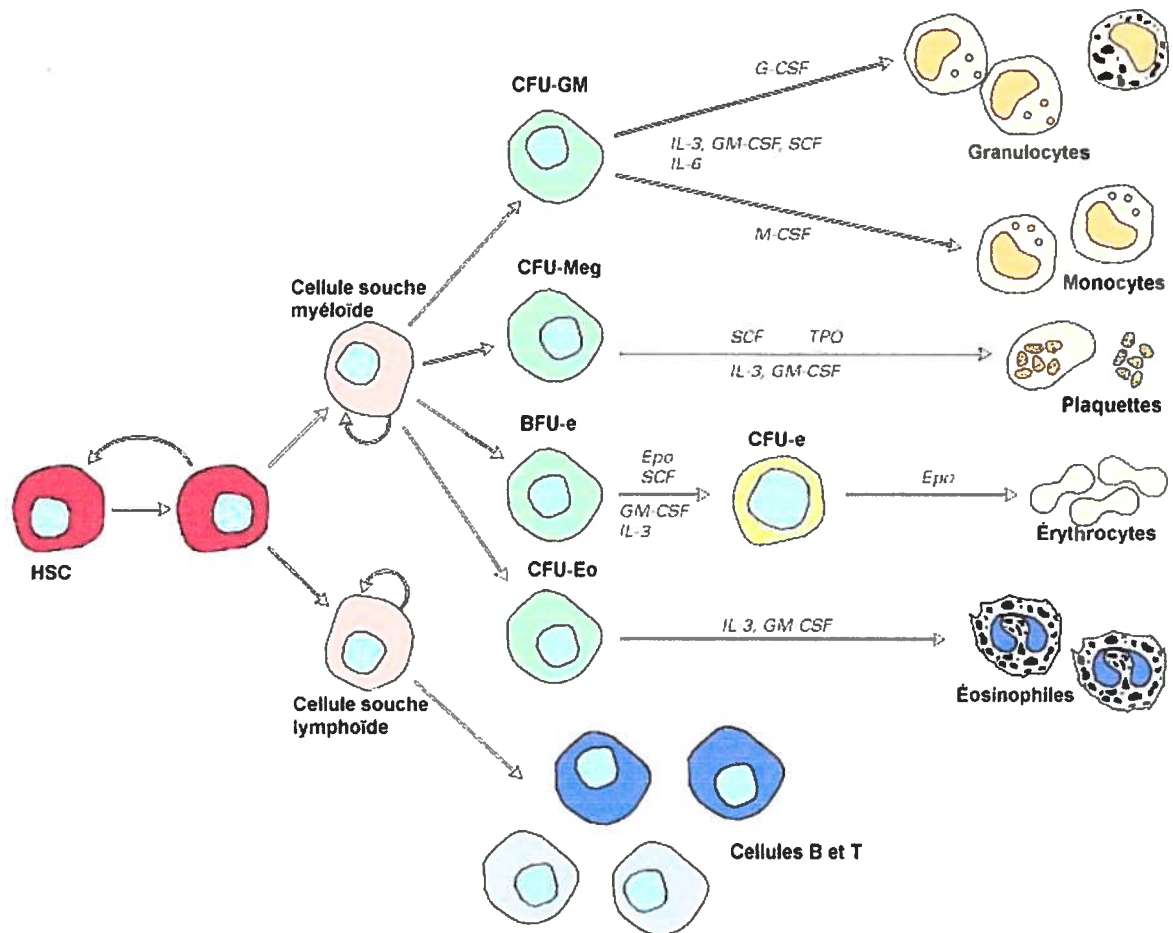
Grâce aux méthodes de culture cellulaire, les précurseurs multipotents et bipotents comme les CFUs et les CFUc ont été rapidement caractérisés et utilisés afin d'étudier les facteurs responsables de la différenciation hématopoïétique. La capacité d'auto-renouvellement de la cellule souche la plus primitive, celle qui est capable de repopuler à long terme, a été démontré, comme son existence, à l'aide de transplantation de cellules de moelle osseuse dans des souris irradiées à des doses létales (Szilvassy et al., 1990). Brecher et al., 1993, ont montré qu'une seule LTR-HSC est capable de se multiplier et de se différencier après avoir été injectée dans une souris irradiée. Par contre, son isolement est beaucoup plus

difficile. Le précurseur le plus primitif, sans être la HSC, présent dans la moelle osseuse humaine a été mis en culture dans les années 90. Ce précurseur possède un potentiel prolifératif élevé et est capable de se différencier dans toutes les lignées hématopoïétiques (Sutherland et al., 1989; Sutherland et al., 1990). Ces précurseurs appelés LTC-IC (cellule initiatrice de culture à long terme), ont été observés après avoir mis en culture des cellules de moelle osseuse sur une couche nourricière de cellules stromales de moelle osseuse pendant cinq semaines. Après cinq semaines, les CFUc observés initialement sont disparus de part leur différenciation ou leur mort et les nouvelles colonies observées résultent de la différenciation des LTC-IC (revue par Hogge et al, 1993).

### 1.1.3 Les cellules matures du système hématopoïétique

Parmi les cellules matures, les cellules les plus différenciées du système hématopoïétique, deux groupes se distinguent soient les cellules myéloïdes et les cellules lymphoïdes. Les cellules myéloïdes comprennent les érythrocytes, les plaquettes, les neutrophiles, les macrophages, les éosinophiles et les basophiles/mastocytes alors que les cellules lymphoïdes comprennent les lymphocytes B et T. Comme les cellules matures ont perdu la capacité de proliférer et ont une courte durée de vie, elles doivent constamment être régénérées à partir de la cellule souche hématopoïétique et de ces précurseurs un peu plus différenciés (voir figure 2).





**Figure 2.** Le système hématopoïétique et ces cellules matures. Adapté de Developmental Biology, 6<sup>e</sup> édition, Scott F. Gilbert.

**Légende de la figure 2 :**

Représentation schématique des précurseurs et des cellules matures du système hématopoïétique.

#### 1.1.4 Différenciation hématopoïétique : système *in vitro*

L'étude des précurseurs hématopoïétiques à partir des cellules de la moelle osseuse est un outil très utilisé pour comprendre l'hématopoïèse normale mais aussi pour étudier l'effet de certaines mutations spontanées affectant ce processus. Nous vous avons présenté certaines techniques *in vivo* et de mise en culture *in vitro* qui sont encore très utilisées aujourd'hui. Mais, une autre approche peut être utilisée afin d'étudier l'hématopoïèse murine.

Avec l'isolement des cellules souches embryonnaires murines (cellules ES), Martin, 1981; Evans et al., 1981 et Doetschman et al., 1985, ont montré que ces cellules, lorsque différenciées spontanément, produisent tous les types cellulaires incluant la lignée hématopoïétique. Les cellules ES dérivent de la masse interne du blastocyste au jour embryonnaire 3.5 et peuvent être maintenues en culture dans un état indifférencié pendant plusieurs générations. Wiles and Keller, 1991 ont développé un modèle *in vitro* de différenciation des cellules ES permettant d'étudier les précurseurs précoces hématopoïétiques. Lorsque les cellules ES sont mises en culture sur un milieu de méthyle cellulose, celles-ci prolifèrent et se différencient pour générer des corps embryonnaires (EBs). Les EBs sont des colonies en trois dimensions qui contiennent plusieurs lignées cellulaires dont des précurseurs de la lignée hématopoïétique.

Keller et al., 1993, ont démontré, en effectuant une analyse des profils d'expression des gènes impliqués dans la transition de l'ectoderme primitif au mésoderme et du mésoderme à la cellule hématopoïétique, que les événements observés durant l'embryogénèse se reflètent durant la différenciation *in vitro* des

cellules ES. Dans les EBs comme dans le sac vitellin, la population de précurseurs érythroïdes primitifs apparaît très tôt et est transitoire. Après cette apparition, les précurseurs érythroïdes définitifs commencent à être observable, suggérant que ces deux populations apparaissent comme des lignées séparées. Il reste à déterminer si ces deux populations proviennent d'un même précurseur commun. C'est ce qu'ont montré, Kennedy et al., 1997, en ajoutant VEGF (facteur de croissance endothéliale vasculaire) et *Steel factor* aux cellules des EBs et en les cultivant pendant 3 à 3.5 jours. Ils ont observé la formation d'une colonie contenant des cellules immatures qui expriment des marqueurs des précurseurs hématopoïétiques tels que  $\beta H1$  et  $\beta^{maj}$  mais qui n'expriment pas *Brachyury*, un marqueur des cellules mésodermiques. Ils ont montré que ces colonies, appelées BL-CFC (cellules formant une colonie-blastique), sont une population transitoire et qu'elles peuvent former des précurseurs érythroïdes primitifs et des précurseurs hématopoïétiques définitifs. Ces résultats sont contradictoires à ceux observés par Nakano et al., 1996, qui montraient que les précurseurs érythroïdes primitifs et définitifs provenaient d'un précurseur différent.

Les membres de la même équipe qui ont isolé les BL-CFC, les ont mis en culture dans du milieu liquide et ont obtenu deux types de populations, soit des cellules hématopoïétiques et des cellules de type stromales adhérentes (Choi et al., 1998). Ils ont montré que les cellules adhérentes présentent les caractéristiques des cellules endothéliales et que les deux populations proviennent d'une seule et même cellule. Ces résultats sont les premiers à suggérer de fortes évidences en faveur de l'hémangioblaste. Le BL-CFC identifié quelques années plus tôt serait

l'équivalent de l'hémangioblaste hypothétique depuis le début du 20<sup>e</sup> siècle. Tous ces résultats rendent le système de différenciation des cellules ES très parallèle à ce qui se passe dans l'embryon dans les premiers stades du développement. (revue par Robertson et al., 1999).

Environ 60% des EBs contient des cellules érythroïdes observables par la coloration rouge de l'hémoglobine produite. L'expression du gène de globine embryonnaire ( $\beta H1$ ) est observable à partir du 5<sup>e</sup> jour de différenciation alors que le gène adulte,  $\beta^{maj}$  apparaît au jour 6. L'ARN de  $\beta H1$  diminue rapidement au jour 12 alors que celui de  $\beta^{maj}$  commence à diminuer.

Ce système de différenciation *in vitro* des cellules ES en fait un bon modèle d'étude pour les mécanismes de régulation des gènes de globine et pour l'hématopoïèse primitive.

## 1.2 Le locus de $\beta$ -globine

### 1.2.1 Arrangement du locus humain et son expression développementale

L'érythropoïèse est la formation des globules rouges et, chez les vertébrés, elle se caractérise par un changement des sites de synthèse, de la morphologie des érythroblastes et de la synthèse de l'hémoglobine au cours du développement. L'hémoglobine est la protéine majeure du globule rouge et constitue environ 15g/dl. L'hémoglobine est un hétérotétramère composé de deux chaînes de type alpha ( $\alpha$ ) et de deux chaînes de type bêta ( $\beta$ ) associées à quatre molécules d'hème.

Le locus humain de  $\beta$ -globine est localisé sur le chromosome 11q15.5 et est constitué des 5 gènes homologues ( $\epsilon$ ,  $\gamma^G$ ,  $\gamma^A$ ,  $\delta$ ,  $\beta$ ) et d'un pseudogène ( $\psi\beta$ ) qui

n'est pas exprimé au cours du développement. Les gènes du locus sont organisés sur le chromosome de la position 5'  $\epsilon$  -  $G\gamma$  -  $A\gamma$  -  $\psi\beta$  -  $\delta$  -  $\beta$  en 3' selon l'ordre de leur expression au cours du développement. En amont du gène  $\epsilon$ , entre 6 et 22 Kb, se trouve quatre sites d'hypersensibilité à la DNase I spécifiques aux cellules érythroïdes. Ces sites sont appelés respectivement 5'HS1 à 5' HS4 et le tout correspond à la région de contrôle du locus (LCR) (Tuan et al., 1985 ; Forrester et al., 1986). Trois autres sites d'hypersensibilité à la DNase I, 5'HS5 à 5' HS7, se retrouvent en amont du LCR mais ne sont pas spécifiques aux cellules érythroïdes (Bulger et al., 1999). Chacun des quatre sites d'hypersensibilité à la DNase I contient un cœur de 200 à 400 pb nécessaire à la liaison de facteurs transcriptionnels et à l'expression de chacun des gènes du locus. De même, 20 Kb en aval du gène de  $\beta$ -globine, il y a un autre site d'hypersensibilité à la DNase, nommé 3'HS1.

Durant le développement embryonnaire humain, les érythroblastes primitifs produisent une hémoglobine embryonnaire composée de deux chaînes  $\zeta$  (type  $\alpha$ ) et de deux chaînes  $\epsilon$  (type  $\beta$ ) ; soit  $\zeta_2\epsilon_2$ . Durant l'érythropoïèse définitive fœtale, l'hémoglobine (HbF) produite par les globules rouges correspond à un tétramère de deux chaînes  $\alpha$  et deux chaînes  $\gamma$  (type  $\beta$ ) ; soit  $\alpha_2\gamma_2$ . À la naissance, les globules rouges contiennent une hémoglobine en plus forte proportion  $\alpha_2\beta_2$  ; soit HbA (environ 98% de l'hémoglobine totale) (Woods, 1982). Le deuxième type d'hémoglobine adulte produite à 1 à 2% correspond à  $\alpha_2\delta_2$  ; soit HbA2. Il y a donc deux commutations de la synthèse de l'hémoglobine, d'embryonnaire à fœtale et de fœtale à adulte.

### 1.2.2 Arrangement du locus murin et son expression développementale

Le locus de  $\beta$ -globine murin possède une organisation qui est très semblable au locus humain, mais il se trouve sur le chromosome 7. Le locus murin est aussi constitué de cinq gènes fonctionnels ( $\epsilon^y$ ,  $\beta H0$ ,  $\beta H1$ ,  $\beta^{maj}$ ,  $\beta^{min}$ ) et de deux pseudogènes ( $\beta H2$  et  $\beta H3$ ). L'organisation des gènes sur le chromosome correspond de 5'  $\epsilon^y$  -  $\beta H0$  -  $\beta H1$  -  $\beta H2$  -  $\beta H3$  -  $\beta^{maj}$  -  $\beta^{min}$  en 3' et comme pour le locus humain, le gène en 5' est exprimé plus tôt au cours du développement que les gènes en 3'. Le locus murin contient aussi en amont du gène  $\epsilon^y$  quatre sites d'hypersensibilité à la DNase regroupés sous le nom de LCR qui sont très homologues en séquence avec les 5' HS du locus humain (Hardison, et al., 1997). Le LCR murin confère aux gènes du locus un haut niveau d'expression, tout comme pour le LCR du locus humain (Bender et al., 2000). Aussi, les sites d'hypersensibilité à la DNase I situés en amont du LCR et en aval du gène de  $\beta$ -globine sont conservés.

Chez la souris, la régulation du locus de  $\beta$ -globine suit aussi le changement des sites d'érythropoïèse. L'érythropoïèse primitive qui débute dans les îlots sanguins du sac vitellin à environ 7.5 jours de gestation produit des érythroblastes primitifs qui synthétisent une hémoglobine embryonnaire. Il y a trois types d'hémoglobines embryonnaires selon Fantoni et al., 1967, soit  $\alpha_2\gamma_2$ ,  $\alpha_2\delta_2$  et  $\alpha_2\epsilon_2$ . La protéine  $\gamma$  est le produit du gène  $\epsilon^y$  alors que la protéine  $\delta$  est le produit du gène  $\beta H1$ . Les globules rouges définitifs produits lors de l'érythropoïèse fœtal et adulte synthétisent seulement une hémoglobine adulte composée de deux tétramères,

soient  $\alpha_2\beta_2^{\min}$  et  $\alpha_2\beta_2^{\max}$  (Wong et al., 1983). Selon ces résultats, même avec trois sites de synthèse (sac vitellin, foie foetal et moelle osseuse), on peut croire qu'il y a seulement une commutation dans la synthèse de l'hémoglobine, d'embryonnaire à adulte. Mais selon Whitelaw et al., 1990, il y aurait aussi deux commutations qui reflèteraient celles observées chez l'humain. Ils ont montré qu'il y a une différence dans les niveaux d'ARNm des gènes  $\beta H1$  et  $\epsilon^y$  ; l'expression de  $\beta H1$  cesse au jour embryonnaire 13.5 alors que  $\epsilon^y$  continue jusqu'au jour embryonnaire 16.5.

### 1.2.3 Études de la régulation du locus de $\beta$ -globine humain *in vivo*

Nous avons déjà mentionné la forte homologie entre les gènes du locus de  $\beta$ -globine humain. Les cinq gènes ont le même arrangement, ils possèdent trois exons et deux introns. De plus, les exons ont sensiblement la même taille qui varie de 91 à 222 nucléotides, alors que les introns ont des tailles très différentes. Le premier intron des gènes du locus est petit (environ une centaine de nucléotides) alors que le deuxième intron est très grand (plus de 900 nucléotides), pouvant contenir des séquences régulatrices.

Le locus de  $\beta$ -globine humain est un excellent modèle pour l'étude de la régulation transcriptionnelle. Étudié depuis longtemps, les gènes du locus de même que le LCR sont déjà bien caractérisés. Que ce soit par l'utilisation en transgénèse de diverses constructions plasmidiques, de cosmides (Strouboulis et al., 1992), ou de chromosomes artificiels de levures (YAC) (Gaensler et al., 1991 ; Gaensler et al., 1993 ; Peterson et al., 1993, 1995, 2002 ; Porcu et al., 1997 ; Liu et

al., 1997) plusieurs éléments *en cis* des locus de  $\beta$ -globine humain et murin ont été caractérisés. Chacun des gènes du locus est régulé par ses régions promotrices proximales, mais plusieurs auteurs ont montré que les niveaux d'expression en souris transgéniques sont trop faibles en comparaison aux gènes de globine endogènes et variables selon la position d'intégration (Magram et al., 1985 ; Chada et al., 1985 ; Townes et al., 1985 ; Kollias et al., 1986,1987). Par contre, certaines de ces études ont permis de définir les régions promotrices minimales requises pour l'expression tissulaire et stade spécifique (Townes et al., 1985). De plus, chacun des gènes avec leurs séquences flanquantes ont aussi été étudiés pour trouver des régions activatrices (Trudel et al., 1987), répresseurs (Berg et al., 1989) de même que des éléments essentiels des promoteurs.

L'activité *enhancer*, l'ouverture de la chromatine, l'insulation et la spécificité développementale sont des rôles qui ont été attribués au LCR et à chacun des coeurs des sites d'hypersensibilité à la DNase (Epner et al., 1998; Bender et al., 2000; Farrell et al., 2000; Schubeler et al., 2000). Chaque HS semble avoir sa particularité fonctionnelle.

C'est en 1987, que Grosveld et al., ont montré par l'utilisation d'un minilocus de  $\beta$ -globine (21 Kb) que le LCR humain conférait des niveaux d'expression élevés indépendamment du site d'intégration, dépendant du nombre de copie du transgène et une expression tissulaire et stade spécifique. Par la suite, ils (Talbot et al., 1989 ; Collis et al., 1990) ont précisé un peu plus les séquences du LCR nécessaires à ses fonctions en le réduisant de 21 Kb à 6.5 Kb. Ce nouveau



microlocus, contenaient seulement les HS de même que leurs séquences flanquantes.

En même temps, Groudine et ses collègues (Forrester et al., 1989) ont réalisé deux LCR tronqués différents afin d'obtenir eux aussi des niveaux d'expression élevés avec la plus petite cassette d'expression possible. Ils ont construit un miniLCR de 8 Kb et un microLCR de 2.5 Kb. Ces deux constructions liées au promoteur des gènes de globine ou à des gènes hétérologues présentent des niveaux d'expression forts et indépendants de la position d'intégration.

#### 1.2.4 Régulation individuelle de chaque gène du locus de $\beta$ -globine humain

L'activation ou la répression de chaque gène de globine à un stade spécifique du développement est régulé par divers mécanismes. Premièrement, la spécificité développementale encodée génétiquement se trouve dans les régions proximales de chacun des gènes. Ces régions contiennent des sites de liaison à des facteurs de transcription présents à différents stades du développement. Un autre mécanisme important dans la régulation développementale est la position relative de chacun des gènes par rapport au LCR. Même si les bases de ce mécanisme ne sont pas vraiment claires, Tanimoto et al, 1999, ont montré que l'inversion des gènes par rapport au LCR amène une expression inadéquate du gène adulte de  $\beta$ -globine au stade embryonnaire et une absence du gène embryonnaire  $\epsilon$  à tous les stades du développement.

Nous avons montré dans les sections précédentes l'importance de certains éléments *en cis*, comme le LCR qui est commun à tous les gènes du locus de  $\beta$ -

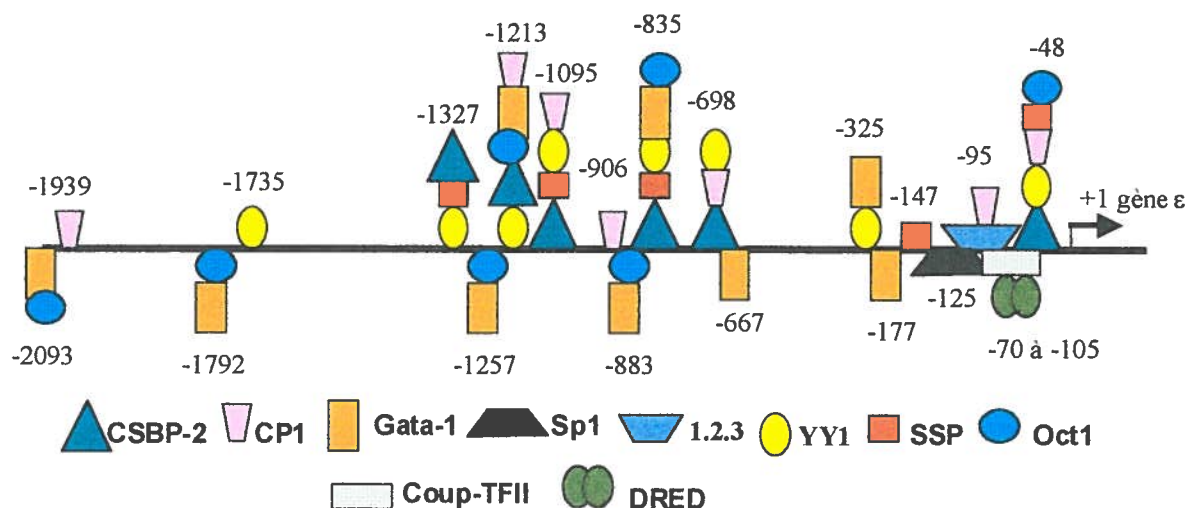
globine. Mais afin que la régulation développementale soit adéquate, le locus nécessite aussi la présence de facteurs *en cis* et de facteurs *en trans* spécifiques à chacun des gènes du locus.

#### 1.2.4.1 Le gène embryonnaire $\epsilon$

Comme nous l'avons déjà mentionné, le gène  $\epsilon$  est exprimé dans les érythrocytes primitifs au stade embryonnaire. En 1990, Raich et al, ont généré des souris transgéniques exprimant le gène humain  $\epsilon$  à l'aide d'une construction liant le gène de 3.7 Kb avec un  $\mu$ LCR de 2.5 Kb. Ce dernier est exprimé au moment de l'érythropoïèse primitive et devient silencieux à partir du moment où l'érythropoïèse définitive prend place. Une région *silencer* entre les positions – 177 et –392 pb du site d'initiation de la transcription a été identifiée comme étant nécessaire mais pas suffisante à la répression du gène  $\epsilon$  (Cao et al., 1989, Raich et al., 1992).

Par comparaison de séquence entre les espèces, 21 régions conservées ont été identifiées en 5' sur une longueur de 2 Kb à partir du site d'initiation de la transcription du gène  $\epsilon$ , mais aucunes parmi les introns ou la région en 3' du gène. Parmi les 21 régions, 5 se sont avérées être liées par la protéine SSP (*stage selector protein*) qui fût tout d'abord associée avec un rôle dans la commutation fœtale à adulte. Aussi, 7 autres sites liant YY1 (*yin and yang 1*) ont été identifiés en dehors de la région répresseuse connue (Gumucio et al., 1993). YY1 est une protéine ubiquitaire qui possède deux fonctions différentes (activateur et répresseur) et qui peut interagir avec d'autres partenaires protéiques. D'autres facteurs tels que GATA-1 et CP1 lient plusieurs séquences non conservées alors

que Oct-1 et Sp-1 lient leur séquence consensus parmi les 2 Kb analysés (voir fig. 3). Le nombre de séquences conservées découvertes et de facteurs impliqués suggèrent que le gène  $\epsilon$  est régulé par ses séquences proximales et non seulement par sa proximité avec le LCR.



**Figure 3.** Schéma des protéines liant la région promotrice du gène  $\epsilon$ . Adapté de Gumucio et al., 1993.

**Légende de la figure 3 :**

Représentation de la région promotrice du gène  $\epsilon$  et des protéines s'y liant à leur position respective.

Certains auteurs ont muté différents sites identifiés par l'étude phylogénétique (Raich et al., 1995). Ils ont, en autres, montré que les motifs liés par GATA-1 et YY1 sont impliqués dans la répression du gène  $\epsilon$  chez l'adulte, suggérant que ces deux protéines seraient des répresseurs. La répression d' $\epsilon$  semble être menée par plusieurs mécanismes (proximité du LCR, interactions protéines – ADN) et divers complexes protéiques.

Comme la souris YAC- $\beta$ -globine est un très bon modèle d'étude pour la régulation développementale, certaines délétions dans le YAC ont été réalisées

afin d'en étudier leur rôle dans le contexte du locus entier. En 1997, Liu et al., ont délété 125 pb correspondant à la région en 5' du gène  $\epsilon$  entre les positions -304 et -179 pb du site d'initiation de la transcription. Cette région est définie comme étant un *silencer* lié par GATA-1 et YY1 responsable de la répression du gène  $\epsilon$  au stade adulte. Étonnamment, ils ont montré que non seulement la délétion de cette région n'augmente pas fortement l'expression d' $\epsilon$  dans le foie fœtal, mais diminue son expression dans le sac vitellin de même que celle des gènes  $\gamma$ . Ceci suggère que cette région est nécessaire mais pas suffisante à la répression et qu'il y a possibilité d'éléments régulateurs positifs à proximité. La délétion de 125 pb modifie probablement l'arrangement spatial nécessaire à la régulation fine d' $\epsilon$ .

Par l'utilisation d'une souris double transgénique, Li et al., 1997, ont montré que la protéine GATA-1 humaine était responsable de la répression du gène  $\epsilon$ . Les souris transgéniques pour le YAC de  $\beta$ -globine (présenté plus haut) ont été croisées avec des souris transgéniques pour la protéine GATA-1 humaine sous le contrôle du promoteur de  $\beta$ -globine et du LCR. Aux jours embryonnaires 9 à 13, la présence de GATA-1 diminue de 5 à 6 fois le niveau d'expression du gène  $\epsilon$  sans affecter le niveau endogène de  $\epsilon^\gamma$ .

Plusieurs autres séquences plus en amont du gène  $\epsilon$ , soit entre le 5'HS1 et les sites GATA-1, ont été identifiées. Elles possèdent soit des activités positives ou négatives sur l'expression d' $\epsilon$  telles que montrées dans des études de transfections de cellules K562 et HeLa (Li et al., 1998).

Certains auteurs suggèrent que l'absence d'expression du gène  $\epsilon$  au stade adulte résulterait de deux mécanismes, soit la répression via GATA-1 et YY1, déjà

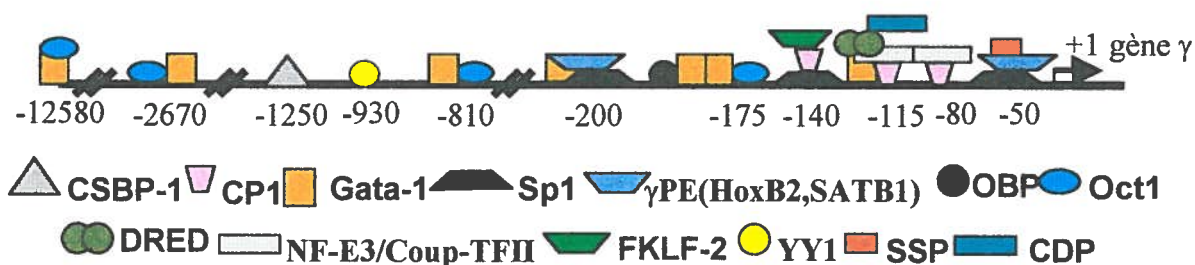
mentionnée, et une absence d'activation au stade adulte. Deux répétitions directes AGGTCA retrouvées en amont du gène  $\epsilon$  semblent jouer un rôle dans ce deuxième mécanisme. Ces répétitions directes sont localisées entre la position -70 pb et -105 pb et il a été montré que le récepteur nucléaire COUP-TFII lie cet élément durant l'érythropoïèse primitive (Filipe et al., 1999). Comme l'expression de COUP-TFII diminue durant l'érythropoïèse définitive (Filipe et al., 1999), les répétitions directes sont liées par un autre facteur DRED (*direct repeat erythroid definitive*). La liaison de DRED préviendrait la liaison de EKLF empêchant donc l'activation du gène  $\epsilon$  au stade adulte (Tanimoto et al., 2000). L'élément lié par DRED est localisé près de la boîte CACCC, connue pour être liée par EKLF (*erythroid Krüppel-like factor*) et responsable de l'activation du gène de  $\beta$ -globine adulte.

#### 1.2.4.2 Les gènes fœtaux $G_\gamma$ et $A_\gamma$

Les gènes fœtaux, chez l'humain, sont exprimés durant le stade fœtal, au moment où l'érythropoïèse prend place dans le foie. Les deux gènes fœtaux sont très similaires entre eux et avec les autres gènes du locus. En effet, les deux gènes fœtaux ne diffèrent que d'un seul acide aminé et leurs séquences promotrices et introniques sont très bien conservées. Plusieurs approches ont été utilisées afin d'analyser la régulation développementale des gènes fœtaux, dont l'étude de liaisons protéiques au promoteur, le transfert de gènes  $\gamma$  tronqués dans des lignées cellulaires érythroleucémiques et la production de souris transgéniques.

Tout comme le gène  $\epsilon$ , les gènes fœtaux possèdent plusieurs régions conservées identifiées par comparaison de séquences. Sur une distance de

1 250 pb en amont du site d'initiation de la transcription de  $G_\gamma$  et  $A_\gamma$ , il y a 13 régions très bien conservées (Gumucio et al., 1992). Ils ont aussi montré qu'une protéine à doigts de zinc lie une région (-1086 pb du cap des gènes fœtaux) ayant une activité répresseuse dans des cellules transfectées et que cette même protéine lie trois régions en amont de  $\epsilon$  et pourrait être identique à YY1. Plusieurs autres facteurs de transcription ont été analysés pour leur liaison à ces régions conservées. Il y a des sites de liaison pour Sp1, SSP, CP1, GATA-1, Oct-1 et YY1 (voir figure 4).



**Figure 4.** Schéma des protéines liant la région promotrice des gènes  $\gamma$ . Adapté de Gumucio et al., 1992.

**Légende de la figure 4 :**

Représentation schématique de la région promotrice des gènes  $\gamma$  et des protéines s'y liant à leur position respective.

Afin de vérifier que ces régions conservées sont fonctionnelles, plusieurs constructions portant des délétions en amont des gènes fœtaux ont été utilisées pour générer des souris transgéniques. Par exemple, Stamatoyannopoulos et al., 1993, ont généré 4 types de souris transgéniques différentes en tronquant diverses régions du promoteur de  $A_\gamma$ . Toutes les constructions utilisées étaient constituées du  $\mu$ LCR, des promoteurs de  $A_\gamma$  tronqués, du gène  $A_\gamma$  ainsi que d'une portion de 530 pb en 3' du site de polyadénylation du gène. Ces constructions ont permis d'identifier trois régions distinctes, soit une région en 5' de -141 pb qui contient

un élément négatif, une région entre -141 et -201 pb qui contient un élément positif et une région entre -382 et -730 pb qui contient un deuxième élément négatif.

Behringer et al., 1990 et Enver et al., 1990, ont montré, en liant au LCR les gènes  $\gamma$  et les gènes adultes dans leur ordre respectif, qu'il y avait une régulation temporelle adéquate, suggérant un mécanisme de compétition entre les gènes fœtaux et adultes. Donc, le mécanisme proposé pour la commutation fœtale à adulte, est une compétition du LCR avec les séquences régulatrices propres à chacun des gènes qui sont liées par des facteurs stades spécifiques. Contrairement à ces résultats, Dillon et al., 1991, ont montré que le gène  $\gamma^A$  était réprimé de manière autonome au stade adulte même en présence du LCR. Ils suggèrent donc que la compétition avec le gène  $\beta$  n'est pas nécessaire et que la présence de facteurs *en trans* régulent la répression des gènes fœtaux au stade adulte.

En 1995, Peterson et al., ont montré en modifiant le YAC de globine (en recréant une mutation humaine à la position -117 pb de  $\gamma^A$ ) que cette région contenait bien un *silencer* et que lorsque muté, il y a persistance de l'expression des gènes fœtaux au stade adulte (Peterson et al., 1995). Plus tard, en 2002, en utilisant encore la souris YAC- $\beta$ -globine, il a montré que la région entre -378 pb et -730 pb du gène  $\gamma^A$  contient un élément *silencer* qui lorsque délété permet une persistance des gènes fœtaux au stade adulte (Peterson et al., 2002).

Comme nous l'avons déjà mentionné, le complexe protéique SSP joue un rôle important dans la commutation fœtale à adulte. Ce complexe contenant la protéine CP2 et d'autres protéines permet la liaison au promoteur des gènes  $\gamma$ .

Parmi ces protéines, on retrouve NF-E4. NF-E4 lie CP2 et est essentiel à la liaison du complexe SSP qui participe à l'activation des gènes fœtaux (Zhou et al., 2000). L'activation complète des gènes fœtaux nécessiterait aussi la présence d'un nouveau facteur de la famille Krüppel, soit FKLF (*fetal Krüppel-like factor*) (Asano et al., 1999).

Tanimoto et al., 2000, ont montré que la répression des gènes fœtaux au stade adulte était médiée via des séquences directes répétées dans le promoteur des gènes  $\gamma$  liées aussi par DRED (Tanabe et al., 2002). Cette observation appuie l'hypothèse de Dillon qui suggère que  $\gamma$  est réprimé de manière autonome au stade adulte.

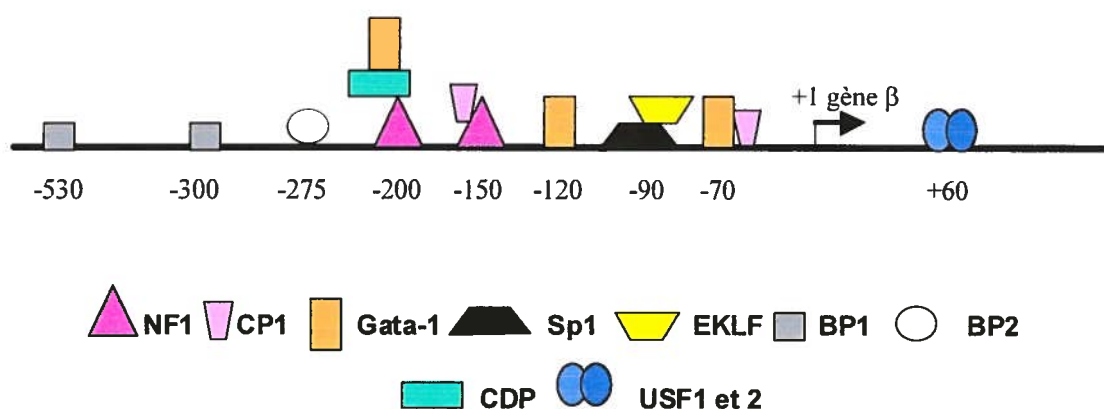
En plus des éléments en 5', les séquences en 3' du gène  $\gamma$  auraient aussi un rôle à jouer dans la régulation des gènes fœtaux. Bodine et al., 1987, ont identifié une séquence en 3' de  $\gamma$  qui possède une activité activatrice dans des cellules transfectées. Plusieurs facteurs connus, dont GATA-1, Sp-1, SATB1 et HOXB2 (Sengupta et al., 1994) lient cette région en 3' riche en AT. HOXB2 avait initialement été identifiée comme une protéine à homéodomaine de 87 KDa liant aussi le LCR et les promoteurs des gènes fœtaux (Lavelle et al., 1991). Un nouveau facteur appelé,  $\gamma$ PE (facteur liant les promoteurs et l'*enhancer* des gènes de  $\gamma$ -globine) possède une activité positive sur les gènes fœtaux (Lloyd et al., 1994) et lient SATB1 et HOXB2 (Case et al., 1999). Cette séquence en 3' posséderait donc une activité positive sur les gènes fœtaux via la liaison de plusieurs facteurs transcriptionnels. Par contre, lorsque cette même région est délétée dans le YAC de 150 Kb, cette délétion de 757 pb n'influence pas la



régulation développementale de tous les gènes du locus. Ce qui suggère que si cette région possède une activité positive *in vivo*, elle peut être compensée par d'autres séquences du locus (Liu et al., 1998).

#### 1.2.4.3 Les gènes adultes $\delta$ et $\beta$ .

Contrairement aux gènes fœtaux qui sont similaires de part leur séquence, les gènes adultes sont plutôt différents entre eux. Pour les premiers 70 pb en amont du site d'initiation de la transcription, les deux promoteurs ont une homologie d'environ 85% qui diminue à 35% pour les 500 pb suivantes (Ebb et al., 1998). De plus, comparativement aux gènes  $\epsilon$  et  $\gamma$ , il y a beaucoup moins de séquences conservées au niveau des promoteurs adultes. Chez le promoteur de  $\beta$ , on observe des sites de liaison pour CP1 et GATA-1 dans les premiers 70 pb alors que ces sites se retrouvent plus en amont dans le promoteur de  $\delta$ . Aussi, le promoteur de  $\beta$  contient quelques sites pour NF1, CDP, GATA-1 et EKLF à la position -200 pb qui sont absents dans le promoteur de  $\delta$ . L'absence de ces sites chez le gène  $\delta$  peut expliquer l'expression moindre observée au stade adulte. Plus en amont de ces sites de liaison, seulement BP1 et BP2 lient le promoteur de  $\beta$ -globine (voir figure 5).



**Figure 5.** Représentation schématique des protéines liant la région promotrice du gène adulte  $\beta$ . Adapté de Ebb et al., 1998.

**Légende de la figure 5 :**

Représentation schématique de la région promotrice du gène  $\beta$  et des protéines s'y liant à leur position respective.

Comme chez les autres gènes du locus, l'importance de ces sites a été étudiée par différentes méthodes, telles que la transfection de cellules, la génération de souris transgéniques et *knock-out*. Un des facteurs les plus caractérisé parmi ceux liant le promoteur de  $\beta$ -globine est EKLF. Ce facteur présent dans les cellules érythroïdes primitives et définitives lie la boîte CACC du promoteur de  $\beta$ -globine (Miller et al., 1993). Deux ans après la découverte de EKLF, deux groupes différents ont généré des souris knock-out. Les résultats observés sont les mêmes ; une mort embryonnaire au jour 14.5 due à une érythropoïèse inefficace. Les niveaux d'ARNm de  $\beta$ -globine sont diminués de 10 fois chez les souris EKLF<sup>-/-</sup> comparativement aux souris hétérozygotes <sup>+/-</sup> (Perkins et al., 1995; Nuez et al., 1995). Par contre, l'érythropoïèse primitive et l'expression des gènes embryonnaires sont normales chez les souris EKLF<sup>-/-</sup>

(Perkins et al., 1995). Ces résultats suggèrent que EKLF joue un rôle critique *in vivo* dans l'expression du gène de  $\beta$ -globine. En même temps, Donze et al., 1995, ont montré que EKLF est exprimé 3 fois plus dans les tissus érythroïdes adultes que fœtaux et qu'il lie le promoteur de  $\beta$ -globine avec plus d'affinité que le promoteur de  $\gamma$ -globine. Avec des expériences de co-transfection dans des cellules K562, ils ont montré que la surexpression de EKLF entraîne une activation de 1000 fois une construction rapporteur de  $\beta$ -globine contre trois fois pour une construction de  $\gamma$ -globine. Leurs résultats suggèrent que EKLF joue un rôle important dans la commutation des gènes fœtaux à adultes. Afin de déterminer le rôle de EKLF chez les gènes de globine humains, des souris hétérozygotes EKLF<sup>+/-</sup> ont été croisé avec des souris YAC- $\beta$ -globine par deux groupes différents (Perkins et al., 1996; Wijgerde et al., 1996). En comparant les souris EKLF<sup>-/-</sup> et <sup>+/-</sup> portant le locus humain, ils ont observé, chez les souris EKLF<sup>-/-</sup> une diminution importante du gène de  $\beta$ -globine et une augmentation de 5 fois des niveaux d'ARNm de  $\gamma$ -globine dans le foie fœtal. De plus, Wijgerde et al., ont observé des niveaux intermédiaires entre les souris EKLF<sup>+/+</sup>, <sup>+/-</sup> et <sup>-/-</sup> portant le locus humain, suggérant un effet de dosage et un rôle de EKLF dans la compétition entre les gènes  $\gamma$  et  $\beta$ . Par contre, la survie de ces souris n'est pas augmentée en comparaison des souris EKLF<sup>-/-</sup> n'ayant pas le locus humain (revue par Perkins, 1999).

Il semble que EKLF joue un rôle dans l'activation du gène de  $\beta$ -globine en partie via sa boîte CACC au niveau du promoteur proximal. Lorsque la boîte CACC du gène de  $\gamma$ -globine, qui a moins d'affinité pour EKLF, est changée par

celle de  $\beta$ -globine, EKLF ne peut activer ce nouveau promoteur de  $\gamma$ -globine (Asano et al., 1998). Par contre, lorsque le promoteur de  $\beta$ -globine est délété de sa boîte CACC, et que cette construction est utilisée pour générer des souris transgéniques, l'expression de  $\beta$ -globine demeure dépendante de EKLF (Guy et al., 2000). Ces observations suggèrent que EKLF ne joue pas son rôle majeur dans l'activation du gène de  $\beta$ -globine via sa boîte CACC. Comme il y a d'autres boîtes CACC dans le locus, par exemple au niveau du LCR, qui ont une bonne affinité pour EKLF, celles-ci pourraient jouer un rôle dans la compétition du LCR pour les promoteurs des gènes du locus.

Une étude, présentée en 2003, nous indique qu'en 3' du promoteur de  $\beta$ -globine, à la position de l'initiateur, la position +20 et +60, il y a des boîtes E. La boîte TATA du promoteur de  $\beta$ -globine est plutôt une CATAAA et l'on sait que cela rend les promoteurs plus faibles. Afin de permettre un bon recrutement et une bonne stabilisation du complexe de transcription, une boîte CATAAA requiert d'autres éléments. Les boîtes E ont la caractéristique de lier des facteurs transcriptionnels de la famille HLH (hélice-boucle-hélice). Leach et al., 2003, nous montrent que le gène de  $\beta$ -globine *in vivo* est lié par USF1, USF2 et TFII-I. *In vitro*, la mutation de la boîte E à la position +60 diminue l'expression de  $\beta$ -globine. Donc, ces boîtes E (plus particulièrement celle à +60) liées par USF1 et USF2, de même que l'initiateur lié par TFII-D, pourrait faire partie du promoteur basal du gène de  $\beta$ -globine.

Le gène adulte de  $\beta$ -globine contient en 3' deux *enhancers* dont un est situé dans le deuxième intron et le second dans la région en 3' du gène. Le premier

*enhancer* est lié par des protéines telles que SATB1, GATA-1 et Oct-1. Ces diverses liaisons suggèrent un rôle de cet *enhancer* dans la régulation du gène de  $\beta$ -globine. Le deuxième *enhancer* en 3' a été délété dans le YAC- $\beta$ -globine et utilisé pour générer des souris transgéniques (Liu et al., 1997). Cette délétion a entraîné une perte d'expression du gène de  $\beta$ -globine dans le foie fœtal et la rate adulte alors que l'expression des gènes embryonnaires et fœtaux n'est pas changée. Ce qui suggère que l'*enhancer* en 3' du gène de  $\beta$ -globine joue un rôle dans l'expression du gène adulte seulement.

Deux modes de régulation sont proposés pour l'expression des gènes de globine. De manière générale, le premier paramètre responsable de la régulation stade et tissu spécifiques est la position relative des gènes du locus par rapport au LCR. Deuxièmement, c'est la liaison de facteurs *en trans*, qui sont exprimés à des stades différents et spécifiques, pour chacun des gènes du locus.

#### 1.2.5 Facteur transcriptionnel GATA-1

GATA-1 est un facteur transcriptionnel qui semble jouer plusieurs rôles dans la régulation de chacun des gènes de  $\beta$ -globine. Tous les promoteurs des gènes du locus contiennent des séquences consensus de ce facteur. La protéine GATA-1 reconnaît une séquence consensus GATA situé dans la région promotrice de plusieurs gènes de la lignée érythrocytaire. C'est donc un facteur transcriptionnel qui joue un rôle important dans l'érythropoïèse humaine et murine.

### 1.2.5.1 Membres de la famille GATA

La famille du facteur GATA contient 6 membres dont les trois premiers ont des rôles dans l'hématopoïèse : GATA-1, GATA-2, GATA-3, GATA-4, GATA-5 et GATA-6 (Yamamoto et al., 1990 ; Wilson et al., 1990 ; Zon et al., 1991; Arceci et al., 1993 ; Laverrière et al., 1994). Les 6 protéines GATA ont en commun un domaine doigts de zinc de configuration Cys-X<sub>2</sub>-Cys-X<sub>17</sub>-Cys-X<sub>2</sub>-Cys, correspondant à deux motifs doigts de zinc. Ce motif doigts de zinc confère aux membres de la famille GATA la propriété de lier l'ADN. Par contre, pour ce qui est de leur expression tissulaire, celle-ci est spécifique à chacun des 6 membres. GATA-2 se retrouve dans des progéniteurs hématopoïétiques plus primitifs, des cellules érythroïdes immatures, des cellules mastocytaires, des mégacaryocytes, des cellules endothéliales et dans des cellules du cerveau au stade embryonnaire (Wilson et al., 1990 ; Zon et al., 1991; Nagai et al., 1994). GATA-3, lui, se retrouve dans les lymphocytes T (Ho et al., 1991 ; Ko et al., 1991 ; Juolin et al., 1991 ; Marine et al., 1991) et dans des tissus non-hématopoïétiques comme le rein, la glande surrénale et le placenta.

### 1.2.5.2 GATA-1

Le gène GATA-1, aussi nommé GF-1, NF-E1 ou Eryf1, lie la séquence consensus (A/T)GAT(A/T)(A/G) retrouvée dans les promoteurs des gènes d' $\alpha$ -globine, de  $\beta$ -globine ainsi que dans les cœurs des sites d'hypersensibilité à la DNase, soit au niveau du LCR (Evans et al., 1988 ; Martin et Orkin, 1989; Wall et al., 1988). De plus, tous les gènes érythrocytaires qui ont été analysés (comme par

exemple, le gène de porphobilinogène déaminase) possèdent des séquences consensus au niveau de leur promoteur et/ou *enhancer* (Plumb et al., 1989 ; Mignotte et al., 1989 ; Youssoufian et al., 1990). Plusieurs auteurs ont suggéré que GATA-1 joue un rôle important dans l'expression des gènes de la lignée érythrocytaire. Ils ont montré que GATA-1 jouait un rôle dans l'activation des gènes de globines lors de la maturation des cellules érythroïdes (Martin et Orkin, 1989; Martin et Orkin, 1990; Evans et al., 1988 ; Reitman et al., 1988 ; Frampton et al., 1990).

L'expression de GATA-1 est restreinte à trois différentes lignées hématopoïétiques : érythrocytaires, mégacaryocytaires et mastocytaires (Evans et al., 1989 ; Tsai et al., 1989 ; Roméo et al., 1990 ; Martin et Orkin, 1990) et aux tubules séminifères et cellules de Sertoli dans les testicules (Ito et al., 1993 ; Yomogida et al., 1994). L'expression de GATA-1 est modulée durant la différenciation hématopoïétique. Whitelaw et al., 1990 ont montré que l'ARNm de GATA-1 apparaît chez l'embryon dans le sac vitellin au moment de la formation des îlots sanguins. Durant l'érythropoïèse embryonnaire, les niveaux de GATA-1 restent faibles pour augmenter dans le foie fœtal entre les jours 12 et 15. Plus particulièrement, GATA-1 est faiblement exprimé dans les progéniteurs multipotents myélo/érythrocytaires et son expression augmente durant la maturation des érythrocytes (Crotta et al., 1990 ; Sposi et al., 1992; Leonard et al., 1993). Par contre, durant la différenciation myéloïde, l'expression de GATA-1 est régulée à la baisse (Sposi et al., 1992).

Afin de déterminer les fonctions exactes de GATA-1 dans la maturation érythrocytaire, celui-ci a été délété du génome murin par recombinaison

homologue (Pevny et al., 1991; Simon et al., 1992). Comme le gène GATA-1 se situe sur le chromosome X, les cellules souches embryonnaires (ES) mutantes mâles (ayant subi une recombinaison) sont dépourvues de l'allèle normal et de l'expression de GATA-1. À l'aide d'une souris chimérique, ils ont montré que les cellules mutantes contribuent à tous les tissus non-hématopoïétiques et aux cellules lymphoïdes mais qu'elles ne participent pas à la production des globules rouges du sang périphérique. Cette expérience a suggéré que GATA-1 est essentiel au développement des érythrocytes définitifs qui expriment les gènes adultes d' $\alpha$  et  $\beta$ -globine et que cette fonction ne peut être compensée par un autre membre de la famille. Afin de déterminer si GATA-1 joue un rôle dans l'érythropoïèse primitive, Simon et al. ont utilisé le système *in vitro* de différenciation des cellules ES. Les cellules ES GATA-1<sup>-</sup> ont été différenciées en corps embryonnaires (EBs) et ceux-ci, contrairement à des cellules ES sauvages, ne forment pas d'îlots sanguins. L'apparence de cellules proérythroblastiques et l'absence d'hémoglobinisation dans les cultures de cellules mutantes suggèrent que GATA-1 est requis pour la maturation des cellules au niveau du sac vitellin au stade embryonnaire. De plus, les EBs des cellules mutantes n'expriment pas les gènes de globine. Par électroporation, GATA-1 murin a été introduit dans les cellules mutantes afin d'observer une réversion des phénotypes. Ils ont montré que l'expression faible de GATA-1 était suffisante pour permettre aux cellules ES mutantes de se différencier adéquatement en cellules primitives *in vitro* (la moitié des EBs transfectants sont hémoglobinisés) et en cellules définitives *in vivo*.



Lorsque l'expression de GATA-1 est augmentée dans ces cellules transfectées, par ajout du 5'HS2, tous les EBs sont hémoglobinisés (revue par Simon, 1993).

Comme la culture *in vitro* des cellules ES s'est développé davantage en 1993 grâce aux travaux de Keller, le rôle de GATA-1 a été défini plus précisément en différenciant les corps embryonnaires en colonies érythroïdes primitives et définitives. Weiss et al., 1994, ont montré que contrairement aux cellules ES sauvages, les cellules ES GATA-1<sup>-</sup> sont incapables de générer des colonies érythroïdes primitives. Pour ce qui est des colonies érythroïdes définitives, leur nombre est similaire aux cellules sauvages mais elles présentent un arrêt de différenciation et une mort au stade proérythroblastique.

L'expression de GATA-2, qui est surtout restreinte aux précurseurs hématopoïétiques, est augmentée de manière significative dans ces colonies érythroïdes définitives. Les auteurs suggèrent que GATA-1 peut être remplacé partiellement par GATA-2 et que GATA-1 réprime GATA-2 durant la différenciation érythroïde. Dans un même ordre d'idées, Pevny et al., 1995, ont aussi montré que les cellules GATA-1<sup>-</sup> provenant du sac vitellin de souris chimériques étaient arrêtées au stade proérythroblastique lors de leur différenciation *in vitro*. Ceci suggère que pour la différenciation terminale des globules rouges, GATA-2 ne peut pas compenser GATA-1 complètement. De plus, ils ont montré que GATA-1 ne semblaient pas requis pour la différenciation des neutrophiles, des macrophages et des mégacaryocytes *in vitro*. Malgré des évidences d'un rôle de GATA-1 dans la différenciation des mégacaryocytes, ils n'ont montré qu'un petit défaut dans le nombre de mégacaryocytes, suggérant que GATA-2 peut remplacer certaines fonctions de GATA-1. En 1997, Shivdasani

montre que GATA-1 joue un rôle important dans la croissance des mégacaryocytes et la biogénèse des plaquettes (Shivdasani et al., 1997).

Malgré que GATA-2 puisse partiellement compenser pour l'absence de GATA-1, les proérythroblastes mutants sont non viables et la différenciation érythroïde s'arrête à ce stade. Weiss et Orkin, 1995, ont montré, par essai TUNEL et microscopie électronique, une augmentation de l'apoptose dans les colonies érythroïdes. Une absence d'élévation des niveaux protéiques du suppresseur de tumeur p53 laisse suggérer aux auteurs que cette apoptose est médiée via un autre mécanisme et que GATA-1 agit aussi comme facteur de survie cellulaire pour les précurseurs érythroïdes.

Par la suite, plusieurs démonstrations ont appuyé le rôle de GATA-1 dans l'érythropoïèse et la mégacaryopoïèse. En 1996, Fujiwara et al., ont montré que les souris mâles hémizygotes délétées de GATA-1 décèdent au jour embryonnaire 10.5 d'anémie sévère avec un arrêt de la maturation érythroïde au stade proérythroblastique (Fujiwara et al., 1996). Un an plus tard, on découvrait un partenaire protéique de GATA-1, soit FOG-1 (friend of GATA) (Tsang et al., 1997). Ils ont montré que FOG-1 est exprimé abondamment dans les cellules érythroïdes et les mégacaryocytes et qu'il est coexprimé avec GATA-1 au cours du développement. Les souris délétées de FOG-1 meurent au jour embryonnaire 10.5 et on observe le même défaut que chez les souris GATA-1<sup>-</sup> (Tsang et al., 1998), suggérant que ces deux facteurs agissent ensemble durant l'érythropoïèse. Cependant, les souris FOG-1<sup>-</sup> ont une mégacaryopoïèse complètement déficiente, ce qui nous porte à penser que FOG-1 jouerait un rôle indépendamment de GATA-1 durant la mégacaryopoïèse primitive (revue par Cantor et Orkin, 2002).

En 1999, Crispino et al., ont montré qu'*in vitro* l'interaction entre GATA-1 et FOG-1, médié par le doigt de zinc en N-terminal de GATA-1, est requise pour une érythropoïèse adéquate (Crispino et al., 1999).

### 1.3 BP1 (beta-protein 1)

#### 1.3.1 Identification de BP1

BP1, pour bêta-protéine 1, est un facteur transcriptionnel qui semble jouer un rôle dans l'érythropoïèse. Sa découverte remonte quand même à quelques années : en 1989, Berg et al., ont découvert, à partir d'extraits nucléaires de cellules de K562, deux protéines pouvant lier la région en 5' du gène de  $\beta$ -globine adulte humain. Les cellules K562 dérivent d'un patient atteint d'une érythroleucémie et n'expriment que les gènes embryonnaires et fœtaux de  $\beta$ -globine. Grâce à des expériences de retards sur gel et à des empreintes à la DNase, ils ont montré que la première protéine, qui a été appelée BP1, lient deux séquences différentes situées entre les positions -550 à -527 pb à partir du site d'initiation de la transcription et -302 à -294 pb. La position à -550 pb est riche en AT et celle à -304 pb correspond au site consensus, soit : (A/T)T(A/C)(A/T)ATATG. La deuxième protéine, appelée BP2, lie une séquence située entre -275 et -263 pb. De plus, ils ont montré à l'aide de transfections dans des K562, que des promoteurs délétés des régions liées par ces deux protéines sont activés davantage lorsque les cellules sont induites par l'hémin, suggérant que ces deux régions agissent comme des *silencers*.

Aussi, certains patients atteints de  $\beta$ -thalassémie ont des mutations dans ces mêmes régions, donc BP1 serait un répresseur potentiel du gène adulte de  $\beta$ -globine (Berg et al., 1989). Ils ont montré qu'une mutation à la position -530 pb du gène de  $\beta$ -globine augmentait la liaison de BP1 et était responsable de la diminution d'expression de  $\beta$ -globine. La mutation étudiée correspond à la substitution d'un T pour ATA à la position -530 pb et est retrouvé chez un porteur du phénotype de  $\beta$ -thalassémie et chez l'haplotype Indien de l'anémie falciforme. Les auteurs suggèrent que la liaison plus forte de BP1 à cette mutation comparativement à la séquence contrôle est responsable de la diminution de synthèse de la chaîne de  $\beta$ -globine chez le porteur de  $\beta$ -thalassémie (Berg et al., 1991). Elion et al., 1992, ont établi une corrélation entre la sévérité de l'anémie falciforme, les haplotypes et la liaison de BP1 à ceux-ci. Les différents niveaux de sévérité de l'anémie falciforme dépendent de la quantité d'hémoglobine S (Hb S), produite par la liaison de deux chaînes  $\alpha$  normales avec deux chaînes  $\beta$  mutées au niveau du codon 6 (substitution d'un acide glutamique pour une valine). Les cinq différents haplotypes de l'anémie falciforme sont définis par un polymorphisme situé à environ 500 pb du site d'initiation de la transcription du gène de  $\beta$ -globine. Ce polymorphisme est constitué d'un motif répété en tandem, soit (AT) $x$ (T) $y$ . Ils ont montré que l'haplotype Indien, dont le polymorphisme est (AT) $_9$ (T) $_5$ , a une affinité plus grande pour BP1 contrairement à l'haplotype Bantu, dont le polymorphisme est (AT) $_6$ (T) $_9$ . Pour ce qui est de la quantité d'Hb S, elle est plus élevée pour l'haplotype Bantu qu'Indien, les auteurs ont donc émis l'hypothèse

que le gène  $\beta^s$  chez l'haplotype Indien était thalassémique, renforçant le rôle répresseur de BP1 pour  $\beta$ -globine.

BP1 a été cloné en criblant une banque d'ADNc, clonée dans  $\lambda$ gt11 fait à partir de cellules K562 humaines, avec un oligonucléotide correspondant au site de liaison de BP1 à la position -300 de  $\beta$ -globine. Un seul clone s'est avéré positif et sa caractérisation a été faite sur ses capacités à lier le promoteur de  $\beta$ -globine. Le gène encodant pour BP1 est localisé sur le chromosome 17q21. C'est une protéine d'environ 32 KDa, qui est exprimé dans les cellules K562, le foie fœtal et seulement deux tissus adultes, le placenta et le rein. De même, l'expression de BP1 est inversement proportionnelle à celle du gène de  $\beta$ -globine lors de la différenciation de cellules MB-02, qui dérivent d'un patient ayant une leucémie mégacaryoblastique et qui correspondent à des progéniteurs érythroïdes pouvant se différencier.

Le séquençage a révélé que BP1 est un membre de la famille des gènes homéotiques (HOX) et plus particulièrement, qu'il appartient à la famille *Distal-less* (DLX). Son homéodomaine de 60 acides aminés et certaines séquences en 3' sont très similaires au gène DLX7. BP1 serait un isoforme de DLX4/7 dont la fonction est inconnue (Chase et al., 2002). Comme les deux sont localisés dans la même région chromosomique et qu'ils semblent être coexprimés, Fu et al., 2001, ont voulu déterminer si DLX7 pouvait aussi réprimer le gène de  $\beta$ -globine. À l'aide de transfection transitoire, ils ont montré que seul BP1 possède une activité répresseuse. Certaines régions riches en alanine et en proline (régions qui pourrait

être associées avec des fonctions activatrices ou répresseurs) sont absentes ou incomplètes chez DLX7, ce qui peut expliquer le manque d'activité répresseur.

Le rôle répresseur de BP1 a été démontré *in vitro*. *In vivo*, il a été montré que certaines leucémies lymphoïdes présentaient une expression aberrante, plus élevée, de BP1. Les niveaux d'expression de BP1 sont normalement très faibles dans la moëlle osseuse et les lymphocytes T et B (Haga et al., 2000). Sa fonction répresseur du gène adulte de  $\beta$ -globine humain n'a pas encore été démontrée *in vivo*.

### 1.3.2 Les membres de la famille Distal-less

#### 1.3.2.1 Chez la drosophile

*Distal-less* (Dll) est un facteur transcriptionnel à homéodomaine identifié chez la drosophile. Il est requis pour le développement de l'axe proximo-distal des membres (pattes et antennes) alors qu'il n'est pas nécessaire à la formation de cet axe dans les ailes. L'expression de Dll dans la patte primordiale embryonnaire représente le premier marqueur spécifique de sa formation. Dll est activé par un membre de la famille des Wnt, soit *Wingless* (Wg) et est réprimé par un homologue de BMP (protéine de la morphogénèse osseuse), soit *Decapentaplegic* (*Dpg*) et par EGF (facteur de croissance épidermique). Dll est capable de s'autoréguler afin de maintenir son expression durant les stades larvaires. Au niveau de l'abdomen, l'expression de Dll et la formation des pattes sont réprimées par l'expression de deux gènes HOX, soient *Ultrabithorax* (Ubx) et *abdominal A* (abdA). Il y a au moins six gènes cibles connus de Dll impliqués dans le

développement des pattes. Dll peut être activateur ou répresseur. (revue par Panganiban et Rubenstein, 2002)

#### 1.3.2.2 Chez l'humain et la souris

Les gènes homologues à *Distal-less* chez les vertébrés sont nommés DLX, chez l'humain et Dlx, chez la souris. L'homme et la souris possèdent chacun six gènes de la famille *Distal-less*. Chez ces deux organismes, les gènes Dlx sont regroupés par paires et chacune est associée à un complexe Hox. Les gènes Dlx1 et Dlx2 sont liés au complexe Hoxd, Dlx3 et Dlx4 au complexe Hoxb et Dlx5 et Dlx6 au complexe Hoxa (McGuinness et al., 1996 ; Nakamura et al., 1996 ; Ozcelik et al., 1992 ; Simeone et al., 1994 ; Stock et al., 1996). Chez l'humain et la souris, Dlx4 et Dlx7 sont le même gène. Comme les gènes Hox, les gènes Dlx proviennent d'un seul ancêtre qui a été dupliqué au cours de l'évolution. L'organisation 3 exons et 2 introns est commune à chaque gène Dlx. L'homéoboîte se retrouve partagée entre les exons deux et trois (Ellies et al., 1997 ; Liu et al., 1997 ; McGuinness et al., 1996 ; Price et al., 1991). Une autre caractéristique commune aux gènes Dlx est la production de multiples transcrits causée soit par une initiation de la transcription alternative ou par un épissage alternatif (McGuinness et al., 1996 ; Liu et al., 1997 ; Nakamura et al., 1996 ; Yang et al., 1998).

Plusieurs auteurs ont étudié les profils d'expression de chacun des gènes Dlx. Il semble que chacune des paires de gènes ait un profil d'expression similaire. Chez la souris, de manière générale, durant la mi-gestation, les six gènes sont exprimés dans les structures dérivées de l'ectoderme, soit le système nerveux et l'ectoderme. Quatre gènes, soit Dlx1, Dlx2, Dlx5 et Dlx6, sont

exprimés dans le système nerveux central (Bulfone et al., 1993 ; Dolle et al., 1992 ; Eisenstat et al., 1999 ; Liu et al., 1997 ; Price et al., 1991 ; Robinson et al., 1991 ; Simeone et al., 1994 ; Yang et al., 1998). Plus tard au cours du développement, les gènes se retrouvent exprimés dans les tissus squelettiques différenciés. Dans les tissus dérivés du mésoderme, comme les cellules hématopoïétiques, on retrouve l'expression de Dlx4 (aussi appelé Dlx7) (Shimamoto et al., 1997,2000).

Tout comme *Distal-less*, les gènes Dlx semblent être régulés par différentes voies de signalisation. Par des études de gain de fonction, on a montré que *Sonic hedgehog* (Shh) induit l'expression de Dlx2 dans le cerveau antérieur (Gaiano et al., 1999). BMP2 induit l'expression de Dlx2 dans les chondrocytes (Xu et al., 2001) alors que BMP4 induit Dlx5 dans les ostéoblastes (Miyama et al., 1999), Dlx1 et Dlx2 dans le mésenchyme dentaire (Bei et al., 1998) et Dlx3 dans l'ectoderme embryonnaire (Feledy et al., 1999). Aussi, FGF (facteur de croissance des fibroblastes) est capable de maintenir ou d'induire l'expression des Dlx alors que l'acide rétinoïque serait impliqué dans la répression de ces gènes.

La fonction de chaque Dlx est difficile à déterminer pour chaque tissu. Car d'autres Dlx sont exprimés dans ces mêmes tissus. Pour détecter un phénotype, il faut déléter une paire de Dlx. Il semble que les gènes Dlx possèdent des fonctions uniques mais aussi redondantes (Bulfone et al., 1993 ; Eisenstat et al., 1999 ; Liu et al., 1997). De manière générale, les gènes Dlx sont impliqués dans des processus développementaux de la neurogénèse à l'hématopoïèse, en passant par la formation des os et du cartilage et par le développement des membres.



Comme Dll et les Dlx sont des facteurs de transcription à homéodomaine, leur principale fonction est de réguler l'expression de gènes cibles. Avec des expériences de transfection transitoire, il a été montré que les protéines Dlx peuvent activer des *enhancers* artificiels (Feledy et al., 1999 ; Masuda et al., 2001 ; Zhang et al., 1997) ou authentiques (Benson et al., 2000 ; Roberson et al., 2001) mais qu'ils peuvent aussi fonctionner comme des répresseurs (Ryoo et al., 1997 ; Yu et al., 2001). Outre leur homéoboîte, Dll et les Dlx partagent aussi plusieurs autres régions ou domaines d'homologie. En C-terminal de l'homéoboîte, ils possèdent deux résidus tryptophane, le premier est suivi d'un résidu d'acide aspartique alors que le second est suivi par une tyrosine. Chez les protéines Hox, des résidus tryptophanes enchâssés dans un motif hexapeptidique en amont de l'homéoboîte est responsable d'interactions avec des co-facteurs de la famille PBC comme Pbx et *Extradenticle* (Exd) (Chang et al., 1995 ; Neuteboom et al., 1995 ; Phelan et al., 1995). La même chose a été observée pour les protéines bHLH et dans les deux cas, les résidus tryptophanes interagissent avec une boucle des trois acides aminés (nommée TALE) entre les hélices 1 et 2 de l'homéodomaine des PBC (Passner et al., 1999 ; Piper et al., 1999). Comme pour Dll et Dlx, les résidus tryptophanes ne sont pas en N-terminal mais bien en C-terminal, une interaction similaire reste à démontrer. En plus des résidus tryptophanes, Dll et les Dlx possèdent des régions riches en proline de part et d'autres de leur homéoboîte. Les régions riches en proline sont connues pour leur capacité à oligomériser (Xiao et al., 2000) et leur capacité d'activation transcriptionnelle (Mermod et al., 1989 ; Tanaka et al., 1990). Jusqu'à maintenant, un seul type de modification post-transcriptionnelle a été démontré. La protéine Dlx3 est phosphorylée par la

protéine kinase C, ce qui réduit la liaison de son homéodomaine à l'ADN (Park et al., 2001). Pour Dll, il a été montré *in vivo*, qu'il peut former un complexe avec *Homothorax* (Hth), une protéine à homéodomaine TALE et *Extradenticle* (Exd), un partenaire de la classe des homéodomains PBC (Panganiban et al., 2002). Ces deux protéines serviraient de cofacteurs à Dll dans le développement de l'antenne. Comme chez les vertébrés, il existe des homologues à *Homothorax* et *Extradenticle* qui sont Meis1-Meis3 et Prep1 (homéodomaine TALE) et Pbx1-Pbx3 (Homéodomaine PBC), il reste à démontrer les interactions possibles avec les protéines Dlx et leur fonctionnalité *in vivo*. Plusieurs cibles des gènes Dlx ont été identifiées, que ce soit les gènes Dlx eux-mêmes ou des gènes impliqués dans le développement embryonnaire (Yu et al., 2001 ; Zerucha et al., 2000).

#### 1.3.2.3 DLX4 (DLX7) : rôle dans l'hématopoïèse

En transfectant un oligonucléotide antisens contre DLX7 dans les cellules K562, Shimamoto et al., 1997, ont montré que la diminution de DLX7 entraînait une élévation de l'apoptose, une diminution des niveaux d'ARNm de GATA-1 et de c-myc. Ce qui laisse suggérer que DLX7 peut être un régulateur de la survie et/ou de la prolifération des cellules hématopoïétiques. Dans une expérience réciproque où DLX7 est surexprimé, on observe une diminution de l'apoptose et une augmentation de la molécule d'adhésion intercellulaire 1 (ICAM-1) (Shimamoto et al., 2000). Cependant, nous ne savons pas si l'activation de GATA-1, de c-myc et de ICAM-1 par DLX7 est directe.

### 1.3.3 Les complexes HOX et leur rôle dans l'hématopoïèse

La plus grande classe de gènes homéotiques est sûrement celle des gènes HOX. Comme les gènes de la famille *Distal-less*, les gènes HOX ont une homéoboîte très conservée de 183 nucléotides et encode pour des protéines à homéodomaine contenant 61 acides aminés. L'homéodomaine des gènes HOX est identique à celui du gène *Antennepedia* chez la drosophile. Cet homéodomaine définit la classe I des gènes homéotiques chez les mammifères. Ces gènes de la classe I sont organisés en quatre complexes qui, comme pour les gènes de la famille *Distal-less*, sont apparus par la duplication d'un gène ancestral afin de former un locus suivi par la quadraduplication du locus formé. Les complexes humains se localisent sur le chromosome 7 pour HOXA ; sur le chromosome 17 pour HOXB; sur le chromosome 12 pour HOXC et sur le chromosome 2 pour HOXD. Tout comme chez la drosophile, l'ordre des gènes dans chaque complexe reflète leur activation spatiale et temporelle au cours du développement. Les gènes en 5' sont exprimés plus dans la partie postérieure de l'embryon alors que les gènes en 3' sont restreints à la partie antérieure, ce qui rend les gènes HOX responsables de la spécification de l'identité de position le long de l'axe antéro-postérieur. Les gènes HOX ne sont pas les seuls gènes homéotiques connus, la plupart des gènes homéotiques n'appartiennent pas à un complexe homéotique. Il existe plusieurs autres sous-familles de gènes homéotiques qui codent pour des facteurs de transcription ayant des fonctions diverses dans le développement et la différenciation cellulaire (revue par Magli et al., 1997; Magli, 1998).

L'expression des quatre complexes dans le système hématopoïétique a été étudiée afin de déterminer si les gènes HOX jouent un rôle durant l'hématopoïèse. Au début des années 90, plusieurs chercheurs ont identifié des profils d'expression différents des complexes HOX parmi des cellules représentant divers stades de différenciation hématopoïétique. De manière générale, ils ont observé que le complexe HOXD n'est pas exprimé dans aucune des lignées hématopoïétiques. Les complexes HOXA et HOXC sont exprimés dans des lignées cellulaires surtout lymphoïdes alors que le complexe HOXB (sur lequel est situé BP1) se retrouve dans les lignées à caractère érythroïde et absent des lignées myéloïdes. (Magli et al., 1991 ; Mathews et al., 1991 ; Vieille-Grosjean et al., 1992a, 1992b) Leurs observations suggèrent que la régulation des gènes HOX joue un rôle important dans la détermination de la différenciation hématopoïétique au cours du développement précoce. De plus, Mathews et al., ont montré que l'expression des gènes du complexe B se retrouvent dans la moëlle osseuse humaine, suggérant que le complexe B est impliqués dans la régulation de l'érythropoïèse.

Plusieurs auteurs ont étudié l'expression aberrante des gènes HOX dans les leucémies. Certaines insertions dans les gènes HOX résultent en leur surexpression, ce qui cause une transformation amenant une leucémie. De plus, certaines translocations chromosomiques observées dans les leucémies impliquent des gènes HOX (revue par Lawrence et al., 1992).

Une autre évidence du rôle des gènes HOX dans l'hématopoïèse est la différence phénotypique observée lorsque l'expression des gènes HOX est modulée. Par exemple, l'expression de HOX B2 corrèle avec la différenciation érythroïde (Mathews et al., 1991). Les niveaux d'ARNm de HOX B2 diminue

avec la différenciation érythroïde des cellules MB-02. Shen et al., 1992, ont montré qu'en augmentant les niveaux d'HOX B2 dans les cellules K562, les niveaux de synthèse des gènes  $\alpha$  et  $\gamma$  globines diminuent, réduisant le potentiel érythroïde. De plus, la surexpression d'un antisens de HOX B2 dans les cellules HEL (leucémie érythroïde humaine) résulte en la maturation érythroïde de ces cellules. Ces résultats suggèrent que la diminution de HOX B2 est nécessaire à la maturation érythroïde.

Malgré les analyses d'expression dans les lignées hématopoïétiques et les leucémies qui suggèrent un rôle des gènes HOX dans l'hématopoïèse, aucun (à l'exception de HOX B2 *in vitro*) n'a une cible connue, ni une fonction directe connue.

## **1.4 Objectif de mon mémoire**

Le but de mon mémoire est d'évaluer le rôle de BP1 sur l'érythropoïèse murine *in vivo* par l'utilisation de souris transgéniques et la culture de cellules souches embryonnaires murines. Nous allons exprimer l'ADNc de BP1 humain dans la lignée érythroïde murine.

# Chapitre 2

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1 Construction plasmidique

#### 2.1.1 Enzymes de restriction et de modification

Les fragments d'ADN plasmidiques et les vecteurs sont générés avec différents enzymes de restriction et de modification selon les recommandations du manufacturier (New England Biolabs Inc. (NEB), Beverley, Massachussets.; Gibco BRL, Burlington, Ontario; Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, New Jersey).

La Klenow (enzyme polymérase 1, large fragment), enzyme de modification permettant de rendre franches des extrémités cohésives par remplissage est utilisée dans certaines étapes de clonage où les enzymes de restriction utilisés n'ont pas des extrémités cohésives compatibles. La réaction de Klenow se fait à 37 °C pendant 30 min en présence de 8.73 U de Klenow et 25 mM de dNTPs chacun pour chaque µg d'ADN. La klenow est ensuite inactivée en chauffant à 65 °C pendant 10 min.

La Mung bean, enzyme ayant une activité endonucléase simple-brin, est utilisée afin d'éliminer quatre paires de bases superflues qui ont été générées lors des étapes de clonage de la construction plasmidique afin de générer des extrémités franches pouvant être reliées. Pour ce faire, le plasmide d'intérêt (4.5 µg) est digéré par un enzyme de restriction (*NcoI*) afin de linéariser le

plasmide. Ensuite, 10 U de Mung bean et 1 mM de  $\text{ZnSO}_4$  sont ajoutés et incubé à 37 °C pendant 30 min. La Mung Bean est inactivée par une extraction phénol / chloroforme / isoamyl (24 :24 :1) et la phase supérieure est précipitée avec deux volumes d'EtOH 100 % et 0.15 M NaCl à -20 °C toute la nuit.

### 2.1.2 Isolement de fragments d'ADN

Les bandes d'ADN, migrées sur agarose et correspondants aux fragments digérés et modifiés voulus, sont isolées par électroélution à 95 V pendant 1 h à l'aide de membranes à dialyse «Spectra/Por», 10 mm (Fisher, Pittsburgh, Philadelphie) ou bien simplement précipités à l'aide de 0.1 M NaCl et deux volumes d'EtOH 95 %, 1 h à -80 °C ou toute la nuit à -20 °C. L'ADN est précipité, ensuite ligué, transformé et les clones potentiels ont été séquencés. Ces clones servent généralement à des étapes subséquentes de clonage ou à la génération de sonde.

### 2.1.3 Réaction de polymérase en chaîne

Un fragment d'ADN, utilisé dans la construction servant à la production d'une sonde pour la protection à la RNase, est généré par PCR. Pour ce faire, deux amorces spécifiques à la région à amplifier sont dessinées. La première amorce située dans le promoteur de  $\beta$ -globine est sens et se définit comme suit : 5'-TAA GCC AGT GCC AGA AGA G-3', alors que la deuxième amorce est située dans l'ADNc de BP1 et est antisens. La séquence de cette deuxième amorce est 5'-TTG TAG GGG ACA AGC CAA G-3'. L'amplification par PCR

est effectuée à partir d'une dilution 1 / 10 000 (142.5 pg/ $\mu$ L ) du plasmide contenant la région à amplifier, dans un volume de 20  $\mu$ L par tube au moyen d'un appareil «Gene Amp PCR System 9 600». Afin d'obtenir suffisamment de fragments d'ADN pour un clonage, l'amplification a été fait sur plusieurs tubes pour un volume final de 200  $\mu$ L. La réaction de PCR s'est déroulée dans un tampon de PCR 1X (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM  $MgCl_2$ , 50 mM KCl et 5 mM  $NH_4Cl$ ) avec 0.125 mM de dNTP, 2.5 U de Taq polymérase (Perkin Elmer, Norwalk, Connecticut) et 20 pmol de chaque amorce spécifique. Les conditions d'amplification sont une série de trente cycles de 1 min à 94 °C, 45 s à 52 °C et 30 s à 72 °C et suivis de 10 min à 72 °C après le dernier cycle. Un aliquot de 10  $\mu$ L des 200  $\mu$ L total est déposé sur gel d'agarose 1.2 % afin de vérifier la présence de la bande spécifique attendue. L'ADN est précipité et utilisé pour le clonage.

#### 2.1.4 Ligation d'ADN

Les ligations des fragments d'ADN sont effectuées à 4 °C ou 16 °C selon que les extrémités d'ADN sont franches ou cohésives pendant 16 h dans un volume de 5  $\mu$ L à une concentration d'ADN d'environ 60 ng /  $\mu$ L en présence de tampon de ligation (Tris-HCL 50 mM pH 7.6,  $MgCl_2$  10 mM, DTT 1 mM, polyéthylène glycol-8 000 2.5 % p/v), BSA 0.1 mg / mL, ATP 1 mM et 0.5 U /  $\mu$ L de T4 DNA ligase (NEB).



### 2.1.5 Transformation

Le produit des ligations (1 à 2  $\mu\text{L}$ ) est introduit dans des cellules bactériennes compétentes par transformation. La transformation s'est effectuée en incubant d'abord l'ADN avec 100  $\mu\text{L}$  de Tris 100 mM pH 8.0 et 200  $\mu\text{L}$  de cellules compétentes *E. coli* DH5 $\alpha$  ( $10^8$  cellules / mL) (Méthode de Sambrook et al., 1989) à 4 °C pendant 30 min puis en imposant un choc thermique à 37 °C pour 5 min. Après le choc thermique, le volume de la transformation est complété à 800  $\mu\text{L}$  avec du milieu LB et incubé sous agitation à 37 °C pendant une heure avant d'être étalé sur un milieu sélectif. Les cultures sont généralement étalées sur des pétris LB contenant 100  $\mu\text{g}$  / mL d'ampicilline puis incubées à 37 °C pendant 16 h.

### 2.1.6 Minipréparation (lyse alcaline)

Les colonies isolées des pétris sont repiquées, inoculées dans 1 mL de milieu LB ayant 100  $\mu\text{g}$  / mL d'ampicilline puis, incubées à 37 °C pendant 16 h. Une adaptation de la technique classique de lyse alcaline (Sambrook et al., 1989) est suivie afin d'isoler l'ADN plasmidique de la façon suivante. Premièrement, le culot bactérien provenant de 1 mL de bouillon de culture est resuspendu dans 100  $\mu\text{L}$  de solution I (lysozyme 2 mg / mL, Tris-HCl 25 mM pH 8.0, glucose 50 mM et EDTA 10 mM pH 8.0) et gardé sur glace pour 15 à 30 min afin de lyser les bactéries. La lyse des membranes bactériennes est favorisée en ajoutant 200  $\mu\text{L}$  de solution II (NaOH 0.2 N, SDS 1 %) sur glace pour 5 min. Après la lyse bactérienne, les protéines sont précipitées en ajoutant 150  $\mu\text{L}$  de solution III

(NaOAc 3 M pH 4.8), en agitant doucement par inversions répétées et en incubant sur glace pendant 1 h. Les protéines sont centrifugées pendant 5 min à 4 °C et au surnageant ainsi récupéré, 1 mL d'EtOH 95 % froid est ajouté afin de précipiter l'ADN plasmidique 30 min à -20 °C. Finalement, le culot d'ADN est lavé avec 100 µL d'EtOH 70 % puis séché sous vide avant d'être resuspendu dans 100 µL de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM pH 8.5). Cet ADN plasmidique est visualisé sur gel d'agarose et analysé par digestion enzymatique. Les clones ayant intégrés les bons inserts dans l'orientation désirée, déterminé par digestion enzymatique et séquençage, sont conservés à -80 °C dans 16 % de glycérol.

#### 2.1.7 Séquençage

La séquence des clones obtenus suite au traitement à la Mung bean est réalisée selon la méthode «dideoxy» décrite par Sanger et al. (1977) en utilisant la trousse de séquençage «Sequenase® DNA Polymerase» (USB, Amersham, Arlington Heights, Illinois). Le plasmide séquencé étant double brin, l'ADN a d'abord subi une étape de dénaturation. À 10 µL d'ADN plasmidique, 15 µL de TE et 50 µL d'une solution de dénaturation (0.2 M NaOH, 0.2 mM EDTA) sont ajoutés et incubés à 37 °C pendant 30 min. L'ADN est précipité en ajoutant 7.5 µL de NaOAc 3 M pH 4.5, et 300 µL d'EtOH 95 % froid. Après une incubation de 30 min à -80 °C et une centrifugation de 15 min, le culot d'ADN est lavé avec 200 µL d'EtOH 70 % froid. Après une centrifugation de 10 min, l'ADN est séché sous vide puis resuspendu dans 7 µL d'H<sub>2</sub>O. Pour effectuer une réaction de séquençage, une amorce spécifique doit être hybridée avec l'ADN dénaturé à

séquencer. Pour ce faire, 0.5 pmol d'amorce et 2  $\mu$ L d'une solution d'appariement (Tris-HCl 40 mM pH 7.5,  $MgCl_2$  20 mM, NaCl 50 mM) sont ajoutés à l'ADN dénaturé. La réaction d'appariement s'est déroulée à 65 °C pendant 2 min puis le mélange est gardé à 25 °C pendant au moins 30 min. Après hybridation, l'ADN séquencé est marqué, c'est-à-dire que des déoxynucléotides radioactifs sont utilisés lors de la polymérisation du brin complémentaire (brin à séquencer). Lors de la polymérisation, deux solutions sont utilisées : une de marquage (2  $\mu$ L de 1.5  $\mu$ M dGTP, 1.5  $\mu$ M dCTP, 1.5  $\mu$ M dTTP diluée 1:5, 1  $\mu$ L de [ $\alpha$ - $^{35}$ S] dATP DuPont (37 Tbq / mmol) (DuPont, Boston, Massachusetts), 1  $\mu$ L de DTT 100 mM et 3.5 U de Séquenase (13 U /  $\mu$ L)) et une de terminaison (2.5  $\mu$ L de 80  $\mu$ M dGTP, 80  $\mu$ M dATP, 80  $\mu$ M dTTP, 80  $\mu$ M dCTP, 50 mM NaCl et 8  $\mu$ M du didésoxynucléotide correspondant à chaque tube). La solution de marquage est ajoutée en premier et incubée à 25 °C pendant 5 min. Ce mélange est réparti (environ 3.5  $\mu$ L) en quatre tubes (identifiés G, A, T et C) contenant déjà 2.5  $\mu$ L de solution de terminaison appropriée. Cette solution de terminaison permet que la polymérisation soit arrêtée à chaque désoxynucléotide correspondant au tube (G,A,T, ou C) par l'ajout du didésoxynucléotide correspondant qui empêche la polymérisation. Après une incubation de 5 min à 37 °C, 4  $\mu$ L d'une solution d'arrêt (formamide 95 %, bleu de bromophénol 0.05 %, bleu de xylène cyanol FF 0.05 % et EDTA 20 mM) sont ajoutés afin d'empêcher la polymérisation de se poursuivre. Les échantillons sont gardés sur glace.

Le gel de séquence consiste en une solution de 12 % acrylamide : bisacrylamide 19 : 1, 7 M d'urée et TBE 1X (89 mM Tris Base,

89 mM acide borique, 2 mM EDTA) à laquelle 100  $\mu$ L de TEMED et 500  $\mu$ L de persulfate d'ammonium 10 % sont ajoutés afin de permettre une polymérisation du gel. Cette solution du gel de séquence est coulée entre deux plaques de verre (36.5 X 41 cm) préalablement siliconisées et un peigne de type dents de requin est utilisé. Après polymérisation d'une heure à température pièce, le gel est installé sur un appareil « SE 1 500 Sequencer » (Hoefer scientific instruments, San Francisco, Californie). Une migration préliminaire à 1 600 V dans du TBE 1X est effectuée afin de réchauffer le gel. Comme chaque réaction de séquençage comprend quatre tubes, correspondant aux quatre didésoxynucléotides, 2  $\mu$ L de chacun sont déposés dans des puits adjacents et l'électrophorèse est lancée à un voltage constant de 1 800 V. Après l'électrophorèse, les plaques de verre sont démontées et un papier Whatman GB 002 est placé contre le gel afin de le décoller de la plaque. Le gel est couvert d'une pellicule transparente puis séché 1 h à 80 °C à l'aide d'un séchoir à gel Bio-RAD (Bio-RAD, Hercules, Canada). Le gel séché est exposé sur un film X-Omat blue XB-1 (Eastman Kodak Co., Rochester, New York) à 25 °C pendant plus de 12 h.

#### 2.1.8 Maxipréparation (gradient de ClCs)

Après croissance bactérienne et amplification du plasmide provenant d'une colonie isolée, les bactéries sont culottées par centrifugation dans un rotor à angle fixe de type Beckman J.A 14 à 3 000 rpm pendant 10 min à 4 °C. Les culots bactériens sont resuspendus dans une solution de sucrose 25 % et Tris-HCl 50 mM pH 8.0 puis incubés sur glace dans une solution de lysozyme 10 mg / mL pendant

10 min afin de lyser les membranes bactériennes. Pour inhiber certains enzymes bactériens, 2 mL d'EDTA 0.5 M pH 8.5 sont ajoutés et 2 mL d'une solution contenant du Triton 0.1 %, de l'EDTA 62.5 mM pH 8.5 et du Tris-HCl 50 mM pH 8.0 sont aussi ajoutés pour précipiter l'ADN génomique. Ce mélange est centrifugé dans un rotor à godets oscillants de type SW 28 à 21 000 rpm à 4 °C pendant 1 h afin de culotter l'ADN génomique bactérien, les protéines et les débris cellulaires. La phase limpide du surnageant contenant l'ADN plasmidique est prélevée et déposée dans un second tube de polyallomère afin d'effectuer une centrifugation sur coussin de ClCs. Pour ce faire, 3 mL d'une solution de TE saturée de ClCs sont déposés dans le fond du tube contenant le surnageant d'ADN plasmidique à l'aide d'une longue pipette pasteur. Le tout est centrifugé à l'aide d'un rotor SW 28 à 21 000 rpm toute la nuit à 20 °C. Le lendemain, la phase inférieure du tube (7.6 mL), contenant l'ADN plasmidique est prélevée puis dissoute dans 4.5 g de ClCs et dans 400 µL de BrEt à 4 mg / mL afin de purifier l'ADN plasmidique superenroulé sur un gradient de ClCs. Après une centrifugation à 50 000 rpm pendant 24 h à 15 °C dans un rotor de type T8-75, la bande contenant l'ADN superenroulé est prélevée à l'aide d'une aiguille 20 G ½. L'ADN purifié est extrait deux ou trois fois avec de l'isopropanol pour enlever le ClCs restant et est ensuite précipité à -20 °C pendant 1 h en présence de quatre volumes d'EtOH 70 % et de 0.15 M final de NaCl. L'ADN est resuspendu et reprécipité au besoin avec du NaCl 0.15 M final et deux volumes d'EtOH 95 % puis lavé à l'EtOH 70 % avant d'être resuspendu dans du TE. Un rendement variant de 0.4 à 1 mg d'ADN est généralement obtenu selon cette méthode.

Toutes les constructions sont conçues de façon à pouvoir être excisées du vecteur plasmidique avant la microinjection compte tenu de l'effet d'inhibition exercé par les séquences procaryotiques sur l'expression des gènes chez la souris transgénique (Aplan et al., 1990).

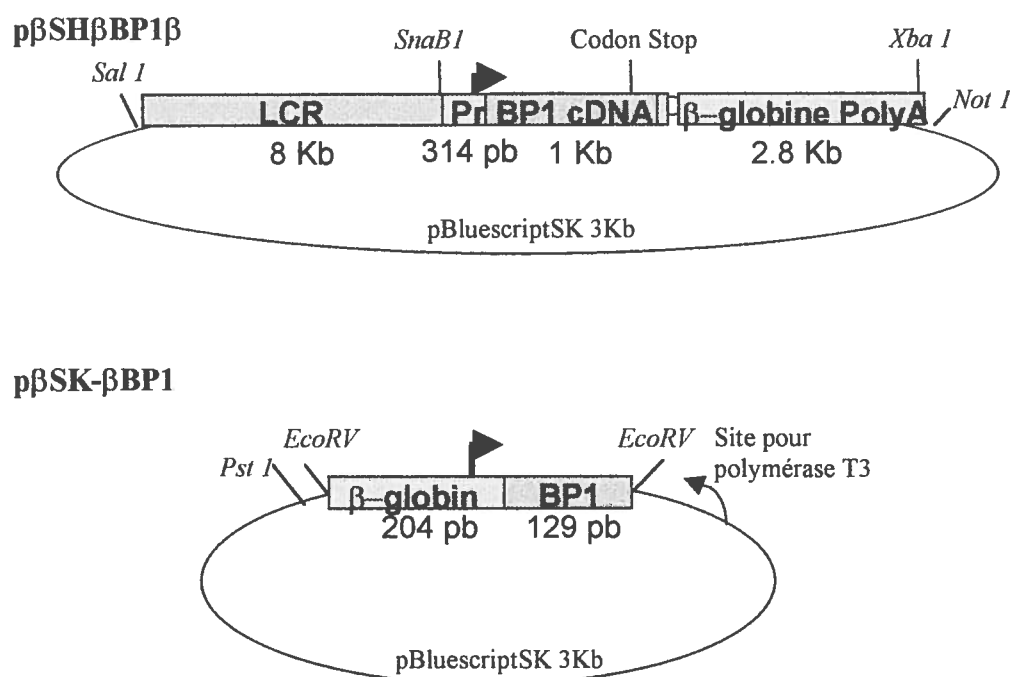
#### 2.1.9 Constructions réalisées

La première étape de la construction utilisée pour la génération des souris transgéniques et la transfection des cellules souches embryonnaires a été produite en insérant le gène de  $\beta$ -globine humain (3.904 Kb *SphI-EcoRV*) dans pGEM5 digéré aussi avec *SphI* et *EcoRV*, nommé pGEM5- $\beta$ glSE. À ce plasmide, la région codante du gène de  $\beta$ -globine a été enlevée en le digérant avec *NcoI* et *BamHI* (428 pb en moins : l'exon 1, l'intron 1 et le début de l'exon 2). Il reste donc du gène de  $\beta$ -globine, 18 pb de l'exon 2, l'intron 2, l'exon 3 et le 3'UTR. Les extrémités du plasmide digéré ont été rendues franches par la Klenow et l'ADNc de BP1 (1.13 Kb) a été lié au plasmide pGEM5- $\beta$ glSE. Cette ADNc de BP1 a préalablement été excisée du vecteur pGEM7 avec *HindIII* et *XbaI* et les extrémités ont aussi été rendues franches par un traitement à la Klenow. Le nouveau plasmide contenant l'ADNc de BP1, le promoteur de  $\beta$ -globine de *SphI* à *NcoI* et la fin de  $\beta$ -globine de *BamHI* à *EcoRV* est nommé pGEM5- $\beta$ BP1 $\beta$ . Comme le site *NcoI* du gène de  $\beta$ -globine correspond au site d'initiation de la traduction, la région codante de  $\beta$ -globine humaine a été remplacée par l'ADNc de BP1. Après séquençage, le site ATG de  $\beta$ -globine humaine s'est avéré être encore présent (reconstitué par la Klenow du site *NcoI*) : CACCATG ( $\beta$ -globine)

GGGCCCTGGCCACAATG (BP1). Comme nous voulions préserver le codon initiateur de BP1 et que de toute manière celui de  $\beta$ -globine n'était pas en phase de lecture avec BP1, le plasmide pGEM5- $\beta$ BP1 $\beta$  a été redigéré avec *NcoI* et un traitement à la Mung Bean a permis d'enlever les quatre paires de bases excédentaires. Le nouveau plasmide obtenu a été nommé pGEM5- $\beta$ BP1 $\beta$   $\Delta$ *NcoI*. Un plasmide pU $\beta$ SH (11 Kb) contenant le LCR a été digéré avec *EcoRI* et traité à la Klenow. À ce plasmide digéré, l'ADNc de BP1 avec le promoteur tronqué (-264 pb) et la région en 3' de  $\beta$ -globine humaine ( $\beta$ BP1 $\beta$ ) ont été liés. Ce fragment a été, tout d'abord, excisé de pGEM5- $\beta$ BP1 $\beta$   $\Delta$ *NcoI* par une digestion *SnaBI* et *XbaI* (4.082 Kb) et les extrémités ont été rendues franches par la Klenow. La construction finale, contenant le LCR, le promoteur de  $\beta$ -globine, l'ADNc de BP1 et le 3' de  $\beta$ -globine, est nommée p $\beta$ SH- $\beta$ BP1 $\beta$  (15 Kb). Les jonctions de cette construction ont été séquencées et vérifiées par digestion enzymatique à chaque étape pour s'assurer de l'intégrité de la construction. La construction linéarisée et excisée du vecteur procaryotique par une digestion *SalI* et *NotI*, nommé LCR $\beta$ BP1 $\beta$  (voir figure 6), a été purifiée sur gradient de CICs et dialysée avant la microinjection.

Une deuxième construction a été générée afin de produire une sonde pour la protection à la RNase. Un fragment correspondant à la fin du promoteur de  $\beta$ -globine et au début de l'ADNc de BP1, a été amplifié par PCR afin de protéger l'ARNm produit par le transgène lors de la protection à la RNase. Un fragment de 333 pb a été amplifié, tel que décrit dans la section 2.1.3, à partir du plasmide pGEM5- $\beta$ BP1 $\beta$   $\Delta$ *NcoI*. Ce fragment a été inséré dans pBluescript KS digéré avec

*EcoRV*, qui donne des extrémités franches et dont un ajout de T, a permis la ligation du fragment amplifié, nommé pBKS- $\beta$ BP1 (voir figure 6).



**Figure 6.** Schéma des constructions finales utilisées pour la microinjection et pour la production de la sonde pour la protection à la RNase.

**Légende de la Figure 6 :**

Les deux constructions finales p $\beta$ SH- $\beta$ BP1 $\beta$  et p $\beta$ SK- $\beta$ BP1 sont représentées sous la forme du plasmide obtenu. Le transgène à microinjecter LCR $\beta$ BP1 $\beta$  sera excisé de p $\beta$ SH- $\beta$ BP1 $\beta$  avec *Sal I* et *Not I*. Le promoteur de  $\beta$ -globine de cette construction ne contient pas les sites de liaison à BP1.

## 2.2 Obtention des lignées de souris transgéniques

### 2.2.1 Préparation des fragments à microinjecter

Les fragments d'ADN utilisés pour la microinjection doivent être exempts de toutes impuretés, c'est pourquoi une méthode de purification sur gradient de



ClCs suivi d'une dialyse est utilisée. L'ADN digéré (25 µg) (excisé du vecteur plasmidique), provenant d'une maxipréparation, est séparé sur agarose. La bande d'ADN d'intérêt est prélevée, excisée de l'agarose et précipitée pour être resuspendu dans 2.4 mL de TE. À notre ADN resuspendu, 3.2 g de ClCs ultrapure (GibcoBRL) sont ajoutés et mélangés doucement en inversant jusqu'à dissolution complète. Après une centrifugation de 48 h à 40 000 rpm à 22 °C dans une centrifugeuse Beckman (Beckman Instruments, Columbia, Maryland) avec un rotor de type SW 60, des fractions de 200 µL sont récoltées et 3 µL sont mis sur gel d'agarose afin d'identifier quelles fractions contiennent l'ADN. Les fractions contenant l'ADN (généralement deux fractions) sont poolées et dialysées. Pour ce faire, les fractions à dialyser sont mises dans une membrane à dialyse «Spectra/Por» et dialysées contre 10 000 fois (400 µL pour 4 L total de tampon) à 4 °C en changeant le tampon (10 mM NaCl, 5 mM Tris pH 7.4 et 0.2 mM EDTA) deux fois par jour. Par la suite, l'ADN dialysé est quantifié sur gel d'agarose. Il est essentiel, lorsque l'on manipule de l'ADN à microinjecter de toujours utiliser du matériel stérile et de rincer tout ce qui est utilisé avec de l'eau filtrée. L'ADN quantifié est dilué dans un tampon d'injection (5 à 10 mM Tris pH 7.4, 0.1 mM EDTA) à une concentration de 3 ng / µL. Une concentration plus élevée d'EDTA (1 mM) de même que la présence de MgCl<sub>2</sub> sont toxiques pour les oeufs (Brinster et al., 1985).

### 2.2.2 Microinjection

La production de souris transgéniques implique trois principales étapes : l'obtention d'oeufs fertilisés au stade d'une cellule, la microinjection d'ADN dans un des deux pro-noyaux et la réimplantation de ces œufs dans l'oviducte d'une femelle pseudo-gestante. Le fond génétique des souris utilisées (F1) pour générer les oeufs dérive d'un croisement de souris C57BL/6 et CBA/J. Dans un premier temps, les oeufs F2 utilisés pour la microinjection sont obtenus à partir d'une femelle F1, âgée de trois à cinq semaines, superovulée par administration intrapéritonéale de 5 U d'hormone FSH (Follicule stimulating hormone) 72 h précédant la microinjection. Environ 46 h plus tard, 5 U de LH (hormone lutéinisante) sont injectés intrapéritonéalement afin de rompre les follicules matures. Les femelles superovulées et fécondées par des mâles F1 sont ensuite sacrifiées par dislocation cervicale et les oviductes sont déposés dans un pétris contenant du milieu M2 (Sigma, St-Louis, Missouri). Les œufs sont récupérés des oviductes un à un dans un second pétris contenant 2.5 mL de M2 et 75 µL de hyaluronidase 10 mg / mL (Sigma, type IV-S) afin de débarrasser les œufs des cellules *cumulus oophorus* qui les entourent. Les œufs sont subséquemment transférés dans un troisième pétri de M2 puis dans un pétri de M16 (Sigma) qui est un milieu plus physiologique pour maintenir les œufs en bon état. Les œufs sont placés dans un incubateur à 37 °C sous 5 % de CO<sub>2</sub>, puis microinjectés un à un avec de l'ADN linéaire évalué à 3 ng / µL. Finalement, les œufs (au stade d'une cellule) sont transférés dans un oviducte d'une femelle pseudo-gestante anesthésiée avec 0.015-0.017 mL d'avertin 2.5 % / g (poids de la souris). Après

dix-neuf à vingt et un jours de gestation, les souris nées ayant incorporé le gène microinjecté sont les souris transgéniques «fondatrices».

### 2.2.3 Établissement des lignées transgéniques

Les souris transgéniques fondatrices ont été accouplées avec des souris F1 de même souche (C57BL/6 X CBA/J) et différentes transmissions sont observées selon que la fondatrice a incorporé le transgène au stade d'une cellule ou ultérieurement. La progéniture issue de chaque souris fondatrice est appelée «lignée transgénique». Toutes les souris d'une même lignée transgénique portent le même nombre de copies du transgène intégré au même locus chromosomique. La génération de souris transgéniques nous permet d'identifier aussi s'il y a présence d'intégration double du transgène. Parmi les souris transgéniques issues d'une même fondatrice, deux profils d'intégration sont observés. Dans ce cas, les deux intégrations sont considérées différentes et chacune correspond à une nouvelle lignée transgénique. Dans le cas où le transgène est incorporé à une étape ultérieure au stade d'une cellule, les souris fondatrices sont appelées «mosaïques» car le gène n'est pas intégré dans toutes les cellules. L'intégration d'un transgène s'effectue souvent en tandem selon une orientation tête à tête ou tête à queue.

## **2.3 Manipulation des cellules souches embryonnaires**

### **2.3.1 Culture des cellules souches embryonnaires (ES)**

Les cellules ES CCE sont maintenues en culture selon la méthode adaptée de Gordon Keller, 1993, dans du DMEM (GibcoBRL) contenant 15 % sérum (FBS (GibcoBRL)). Ce FBS doit préalablement être testé pour maintenir les ES indifférenciées en présence de LIF (leukemia inhibitory factor) et différenciées en absence de LIF. Le milieu de culture contient aussi 2 mM glutamine (GibcoBRL), 0.1 mM acides aminés (GibcoBRL), 1 mM pyruvate de sodium (GibcoBRL), pénicilline (50 mg / L) et streptavidine (100 mg / L) (Sigma), 0.15 mM MTG (Monothioglycérol) et 1 000 U / mL de LIF. Les cellules ES sont incubées dans des pétris traités à la gélatine 0.1 % (Sigma) dans du PBS 1X. Le milieu est changé à chaque jour et les passages (trypsinisation et changement de pétris à une densité moindre) sont effectués à tous les deux jours.

### **2.3.2 Production des cytokines**

Afin de différencier les cellules ES en corps embryonnaires et en colonies érythroïdes, l'utilisation de cytokines est essentielle. Ces cytokines vont activer des voies de différenciation spécifique à chaque type cellulaire. Les cellules COS-7 sont des cellules mammifères permettant l'expression de plasmide de manière transitoire et la sécrétion dans le milieu de culture des cytokines d'intérêt (provenant du plasmide transfecté). Les cellules COS-7 sont donc transfectées par des plasmides contenant les cytokines LIF, IL-3, SCF et Epo afin d'obtenir de grandes quantités. La transfection transitoire de ces plasmides dans les cellules

COS-7 est faite par électroporation. Pour ce faire, 20  $\mu\text{g}$  d'ADN plasmidique, purifié par maxipréparation, sont incubés avec  $1 \times 10^7$  cellules COS-7 dans 700  $\mu\text{L}$  de milieu DMEM seul, 10 min sur glace. L'électroporation est faite dans des cuvettes Bio-RAD 0.4 cm, à 250 V et 960  $\mu\text{F}$ . Après une deuxième incubation de 10 min sur glace, les cellules transfectées sontensemencées dans trois pétris 10 cm avec 15 mL de DMEM / 10 % sérum et incubées pour une période de trois à quatre jours à 37 °C sous 5 % de  $\text{CO}_2$ . Les surnageants sont, par la suite, récoltés et gardés à 4 °C.

Afin de déterminer la concentration des cytokines en ng / mL ou en U / mL, l'utilisation de cellules dépendantes des cytokines étudiées est nécessaire. Pour ce faire, les cellules Baf3 sont utilisées pour l'IL-3 ; les cellules Baf3/EpoR, pour l'Epo ; les cellules B6SuIA, pour SCF. La concentration est déterminée par la prolifération de chaque cellule à l'aide de l'incorporation à la thymidine tritiée. Les cellules sont maintenues en culture dans du RPMI (GibcoBRL) contenant 10 % sérum, 2 mM glutamine et 5 ng / mL d'IL-3. L'incorporation à la thymidine tritiée s'effectue dans des plaques quatre-vingt-seize puits Nunc (VWR Scientific, San Francisco, Californie) à fond rond. Tout d'abord, les cellules sont incubées 6 h en absence d'IL-3. Cette déprivation en IL-3 est nécessaire afin de réaliser une bonne incorporation de thymidine tritiée. Après les 6 h de déprivation, les cytokines sont mises dans une plaque de quatre-vingt-seize puits, en commençant par la concentration maximale pour chaque type de cellules et en effectuant des dilutions 1 : 1 avec 20  $\mu\text{L}$  de RPMI, tout en laissant le dernier puits sans cytokines. Les concentrations maximales sont : pour Baf3,

10 ng / mL de IL-3, pour Baf3/EpoR 0.6 U / mL d'Epo et pour B6SuIA, 100 ng / mL de SCF et un standard connu est utilisé comme contrôle. À chaque dilution de cytokines, on ajoute  $3.5 \times 10^4$  cellules du type approprié. Les dilutions sont faites en duplicata. Les cellules sont incubées pendant 18 à 19 h à 37 °C sous 5 % de CO<sub>2</sub>. Après cette incubation, une quantité de 37 Kbpq de thymidine tritiée (Perkin Elmer) par puits est ajoutée pour une période de 2 h pour IL-3, 2.5 h pour l'Epo et 3 h pour SCF afin de mesurer la prolifération cellulaire. Les cellules sont récoltées sur une membrane UniFilter GF/B (Canberra Packard Canada, Perkin elmer) à l'aide du «cell harvester» FilterMate universal. Cette membrane est séchée à l'air libre pendant 30 min, scellée et 20 µL du liquide à scintillation MicroScint-O sont ajoutés à chaque puits. L'incorporation de thymidine tritiée est mesurée à l'aide du «Top count» (Canberra Packard Canada). Après que la concentration est établie, par comparaison de l'incorporation de thymidine tritiée avec le standard connu, les surnageants des cytokines sont aliquotés en petit volume et gardés à -20 °C ou -80 °C.

Pour ce qui est du LIF, celui-ci est testé directement sur les cellules ES CCE utilisées pour la génération des transfectants stables. Les cellules ES sont mises en culture en présence de différentes concentrations de LIF pour quelques passages. La concentration du LIF est évaluée en fonction des cellules ES qui sont restées dans un meilleur état indifférencié en comparaison avec un contrôle connu.

### 2.3.3 Électroporation des cellules ES et sélection des transfectants stables

L'électroporation est réalisée comme pour les cellules COS-7, excepté que  $1 \times 10^7$  cellules ES sont mises en présence de 10  $\mu\text{g}$  d'ADN plasmidique. L'électroporation est faite à 200 V au lieu de 250 V et les cellules sontensemencées dans deux pétris 10 cm avec du milieu pour cellules ES (décrit plus haut). En plus de l'ADN plasmidique correspondant à la construction, un plasmide contenant le gène néomycine (PSV3Néo) est aussi transfecté, donc la sélection des cellules ES transfectées est faite en présence de G-418, Geneticin (GibcoBRL). Pour ce faire, 24 h après l'électroporation, 200  $\mu\text{g} / \text{mL}$  de G-418 sont ajoutés aux cellules transfectées. La sélection est augmentée à 400  $\mu\text{g} / \text{mL}$  de G-418 48 h plus tard et est poursuivi pendant cinq jours pour revenir à 250  $\mu\text{g} / \text{mL}$  pendant quatre jours supplémentaires. Au douzième jour, les colonies résistantes sont repiquées à l'aide de buvards trypsinisés (Papier 3M (Mandel Scientific Co inc, Guelph, Ontario) et Trypsin, (Sigma)). Ces colonies sont remises en culture dans du milieu sélectif pour cellules ES afin d'obtenir une quantité importante de cellules pour effectuer la congélation et l'analyse Southern de ces clones stables.

### 2.3.4 Congélation et décongélation des cellules

Les cellules sont congelées à une densité d'environ  $3 \times 10^6$  cellules / vial à congélation (Sarstedt, Newton, Caroline du Nord) dans du milieu de congélation composé de 90 % sérum et 10 % DMSO (Sigma) pour les cellules ES CCE et les transfectants et dans 50 % sérum, 40 % DMEM et 10 % DMSO pour les autres

types cellulaires. Les vials sont congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Les cellules sont décongelées rapidement, transférées dans du milieu DMEM contenant 10 % sérum, centrifugées à 1 200 rpm pendant 5 min et ensemencées dans du milieu adéquat puis incubées à  $37^{\circ}\text{C}$  sous 5 % de  $\text{CO}_2$ .

### 2.3.5 Différenciation des cellules souches embryonnaires en corps embryonnaires

La différenciation des cellules ES en corps embryonnaires se fait de manière spontanée en absence de LIF et en présence d'acide ascorbique. Les cellules ES trypsinisées sont ensemencées dans du milieu de différenciation constitué d'IMDM (GibcoBRL) contenant 15 % FBS, 2 mM glutamine, 50  $\mu\text{g} / \text{mL}$  d'acide ascorbique (Sigma), 5 % PFHM-II (Protein-free hybridoma medium) (GibcoBRL) et 0.3 mM MTG et incubées à  $37^{\circ}\text{C}$  sous 5 % de  $\text{CO}_2$ . La différenciation en milieu liquide, telle que décrite ici, se fait dans des pétris bactériologiques 60 mm (Fisher) à une densité de  $1.5 \times 10^3$  cellules / pétri et peut être effectuée sur une période de différenciation de huit jours. L'obtention de corps embryonnaires de plus de huit jours se fait dans un milieu semi-solide. Pour ce faire, au milieu de différenciation déjà décrit, 50 % de MeC (méthylcellulose) (Fluka Chemical, Ronkonkoma, New York), 300  $\mu\text{g} / \text{mL}$  de transferrine (Calbiochem, San Diego, Californie), 25 ng / mL SCF et 1 ng / mL d'IL-3 sont ajoutés. Au neuvième jour de culture, on ajoute aux corps embryonnaires une solution contenant 25 % MeC, 10 % FBS, 25 ng / mL de SCF, 1 ng / mL d'IL-3 dans du IMDM.



### 2.3.6 Différenciation des corps embryonnaires en colonies hématopoïétiques

Les corps embryonnaires des jours 7 et 10 sont utilisés pour différenciation en colonies hématopoïétiques. Les EBs de jour 7 sont trypsinisés alors que les EBs de jour 10 sont traités à la collagénase afin de conserver les récepteurs membranaires intacts. Pour ce faire, le milieu semi-solide contenant les EBs est dilué 1 / 10 dans du IMDM / 15 % FBS, ce qui a permis aux corps embryonnaires de sédimenter. Les EBs ne sont pas centrifugés. À chaque clone différencié en EBs (un pétris, environ 300 EBs), 1.3 mL de solution de collagénase (Sigma) (25 mg de collagénase dans 8 mL de PBS, agité 45 min à température pièce, filtré et ajouté à 2 mL de FBS) sont ajoutés et incubés à 37 °C sous 5 % de CO<sub>2</sub> sous agitation douce pendant 2 h. Les EBs trypsinisés ou dissociés par collagénase sont ensemencés dans un milieu de différenciation pour colonies hématopoïétiques, semi-solide. Ce milieu est constitué d'IMDM contenant 50 % MeC, 10 % FBS, 5 % PFHM-II, 200 µg / mL transferrine, 100 ng / mL SCF, 5 ng / mL d'IL-3, 2 U / mL d'Epo et 0.45 mM MTG. La différenciation est faite dans des pétris de culture Corning 35 mm (VWR Scientific) à une densité de  $1 \times 10^5$  cellules / pétris et incubé à 37 °C sous 5 % de CO<sub>2</sub> pendant trois jours pour les colonies érythroïdes primitives et sept jours pour les colonies érythroïdes définitives.

## 2.4 Étude de la structure du transgène

### 2.4.1 Extraction d'ADN

L'identification des fondatrices transgéniques et de leur progéniture est effectuée en isolant de l'ADN de la queue digéré avec un enzyme de restriction et

hybridé avec une sonde spécifique au transgène après un transfert Southern. Chaque progéniture issue d'un croisement de souris transgéniques est analysée pour la présence du transgène. L'ADN génomique est extrait selon Hogan et al., 1986 à partir de 1.0 cm de queue digérée dans un tube de 1.5 mL (Sarstedt) avec 17.5 µL de protéinase K (20 mg / mL) (Boeringer Mannheim) dans un tampon 10 mM Tris pH 8.0, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl et 10 % SDS. L'incubation s'est effectuée à 55 °C toute la nuit sur une plateforme berçante. Une première extraction protéique avec 600 µL de phénol équilibré avec du tampon 1 M Tris pH 8.0 est effectuée en agitant vigoureusement les tubes 3 min puis, en les centrifugeant 3 min à 13 500 rpm. La phase phénolée contient les protéines alors que le surnageant contient l'ADN génomique. Une deuxième extraction au phénol / chloroforme / alcool isoamyl (24 :24 :1) est faite de façon similaire. L'ADN génomique, contenu dans la phase aqueuse prélevée, est précipité en ajoutant 60 µL de NaOAc 3 M pH 6.0 et 600 µL d'EtOH 95 %. Le tout est mélangé par inversion puis centrifugé 3 min. Finalement, le culot d'ADN génomique est lavé avec 100 µL d'EtOH 70 %, séché sous vide et resuspendu dans 100 µL de TE. Un rendement d'environ 1 µg / µL d'ADN génomique est ainsi obtenu. L'ADN génomique extrait des cellules ES s'est effectué selon la même méthode à partir d'un pétris de 100 mm confluent.

#### 2.4.2 Transfert Southern

Les échantillons d'ADN génomique (~10 µg) sont digérés dans un volume final de 30 µL : en présence de tampon 1X, correspondant à l'enzyme de

restriction utilisé, de BSA 0.1 mg / mL, de spermidine 0.003 M, de RNase A 0.017 M et de 5 U d'enzyme. La digestion se fait à 37 °C toute la nuit. Les échantillons digérés sont soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose 1.0 %. Les contrôles positifs sont évalués à une et dix copies du transgène par génome soit 19 pg d'ADN linéaire pour un transgène de 11.5 Kb. Le gel est coloré au BrEt et est photographié et traité dans une solution dénaturante (1.0 M NaCl et 0.5 M NaOH) 30 min et dans une solution neutralisante (3.0 M NaCl et 0.5 M Tris pH 7.4) pendant 1 h. L'ADN est transféré avec du SSC 10X (3.0 M NaCl et 0.15 M sodium citrate pH 7.0) sur des membranes Hybond-N (Amersham) selon la technique de Southern (Southern, 1975). L'ADN transféré est fixé à la membrane par exposition aux UV (UV Stratalinker, 2 400). Les membranes sont préhybridées à 65 °C dans une solution de 5X SSC (1.5 M NaCl, 0.075 M sodium citrate), 10X Denhart (1 g de ficoll, type 400, Pharmacia; 1 g de polyvinylpyrrolidone; 1 g de BSA, fraction V dans 50 mL d'eau), 0.1 % SDS et de l'ADN de sperme de saumon soniqué et dénaturé 0.1 mg / mL pour au moins 4 h et hybridés dans les mêmes conditions pendant 16 h. Cette hybridation est faite avec des sondes spécifiques au transgène qui sont marquées au  $^{32}\text{P}$  par « Nick translation » (Maniatis et al., 1975). Le taux d'incorporation des sondes mesuré sur des filtres Whatman grade 1 doit atteindre entre 30 et 50 % de radioactivité incorporée. Les membranes sont lavées dans la solution I (SSC 2X (0.6 M NaCl, 0.03 M sodium citrate), SDS 0.1 %) 30 min à 65 °C et dans la solution II (SSC 1X (0.3 M NaCl, 0.015 M sodium citrate), SDS 0.1 %) 30 min à 65 °C et en dernier dans la solution III (SSC 0.1X (0.03 M NaCl, 1.5 mM sodium citrate), SDS 0.1 %)

1 h à 65 °C. Les membranes lavées sont exposées avec des films X-Omat blue XB-1 (Eastman Kodak Co.) pendant 24 h à -80 °C.

## 2.5 Vérification de l'expression

### 2.5.1 Extraction de l'ARN (Guanidium et Trizol)

L'ARN total est extrait des organes ou du sang frais ou gardé à -80 °C en utilisant la méthode d'extraction au thiocyanate de guanidium (Chirgwin et al., 1979). Les cellules sont lysées au Polytron dans 3 mL d'une solution contenant 4 M de thiocyanate de guanidium (Fluka), 0.5 % de sarcosyl (Sigma), 25 mM de citrate de sodium pH 7.5, 0.1 M de  $\beta$ -mercaptoéthanol dans de l'eau DEPC (diéthylpolycarbonate) pendant 30 s. Ensuite, 2.5 mL du lysat est déposé sur un coussin de 1.4 mL de ClCs (5.7 M ClCs, 25 mM de NaOAc pH 5.0, 10 mM EDTA, 0.2 % DEPC dans de l'eau traitée au DEPC à une densité de 1.70 à 1.72 g / mL). La centrifugation de l'ARN sur ce coussin s'est faite dans des tubes traités au DEPC dans un rotor SW 60 pendant 16 h à 36 000 rpm à 20 °C. Le culot d'ARN est resuspendu dans 100  $\mu$ L de GuHCl 7.5 M (7.5 M GuHCl (Sigma), 25 mM de citrate de sodium pH 7.0, 5 mM DTT dans de l'eau DEPC à pH 7.0) de quatre à cinq fois à un intervalle d'environ 15 min. L'ARN contenu dans ces 100  $\mu$ L est transféré dans un tube stérile et 100  $\mu$ L de GuHCl 7.5 M est ajouté sur le culot pour une deuxième resuspension de deux à trois fois. Les 200  $\mu$ L d'ARN resuspendus sont précipités avec 5  $\mu$ L d'acide acétique 1 M DEPC et 102  $\mu$ L d'EtOH 95 % froid pendant minimum 1 h à -20 °C. L'ARN précipité et centrifugé 45 min à 13 000 rpm à 4 °C, est lavé avec 100  $\mu$ L d'EtOH 95 %

froid. Le culot d'ARN séché est resuspendu avec 50  $\mu$ L d'eau DEPC, centrifugé et le surnageant contenant l'ARN est récolté. La resuspension du culot d'ARN est poursuivie avec 25  $\mu$ L d'eau DEPC jusqu'à resuspension complète ou au maximum quatre fois. L'ARN obtenu (environ 150  $\mu$ L) est précipité avec 0.1 M final de NaOAc 3 M pH 5.0 et deux volumes d'EtOH 95 % froid à  $-20^{\circ}\text{C}$  toute la nuit. L'ARN précipité, centrifugé et lavé est resuspendu dans 25  $\mu$ L d'eau DEPC. La quantification de l'ARN est faite par densité optique dans du triéthanolamine 0.01 M alors que l'intégrité de l'ARN quantifié ( $\sim 1$   $\mu$ g) est observée sur gel d'agarose 1.5 % / formaldéhyde par l'identification des ARN ribosomiques 28S et 18S.

L'ARN total des cellules ES indifférenciées, des EBs et des colonies hématopoïétiques repiquées est extrait avec du Trizol (Invitrogen, San Diego, Californie) avec quelques modifications pour les colonies hématopoïétiques qui ont beaucoup moins de cellules. Au culot de cellules, 1 mL de Trizol sont ajoutés (250  $\mu$ L pour les colonies) et incubé à  $25^{\circ}\text{C}$  pendant 5 min. Pour précipiter les protéines, 0.2 mL de chloroforme (50  $\mu$ L pour les colonies) sont ajoutés et mélangés vigoureusement pendant 15 s, suivi d'une incubation à  $25^{\circ}\text{C}$  pendant 2 à 3 min et d'une centrifugation à 10 000 rpm à  $4^{\circ}\text{C}$  pendant 15 min. La phase aqueuse contenant l'ARN (excepté pour les colonies) est transférée et précipitée avec 0.5 mL d'isopropanol, incubée pendant 10 min à  $25^{\circ}\text{C}$  et centrifugée à 10 000 rpm pendant 10 min à  $4^{\circ}\text{C}$ . Le culot d'ARN obtenu est lavé avec 1 mL d'EtOH 75 %, séché à l'air libre et resuspendu dans 25  $\mu$ L d'eau DEPC. L'intégrité ( $\sim 1$   $\mu$ g d'ARN) est aussi vérifié sur gel d'agarose

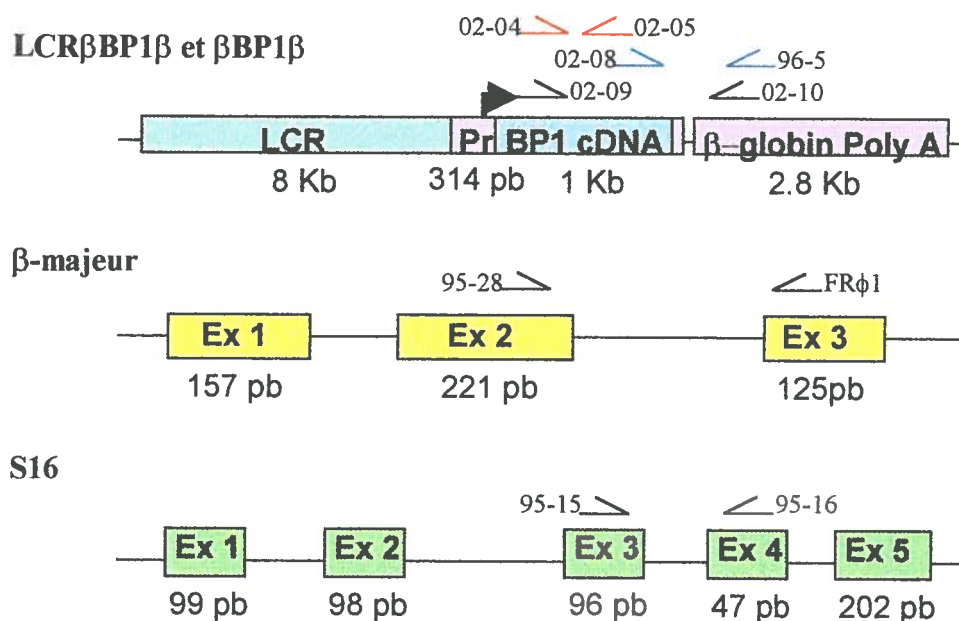
1.5 % / formaldéhyde. Pour les colonies, la précipitation de la phase aqueuse contenant l'ARN est faite en ajoutant 25  $\mu\text{L}$  de NaOAc 7.5 M DEPC, 150  $\mu\text{L}$  d'EtOH 95 % et 1.5  $\mu\text{L}$  de polyacrylamide transporteur DEPC, incubé à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  toute la nuit. Après une centrifugation de 5 min, le culot d'ARN est lavé avec 150  $\mu\text{L}$  d'EtOH 70 % DEPC et séché à l'air pendant environ 10 min.

### 2.5.2 RT-PCR

La synthèse de l'ADNc est effectuée dans un volume de 20  $\mu\text{L}$  à partir de 1  $\mu\text{g}$  d'ARN total dénaturé pour les organes, les cellules ES et les EBs. La réaction de RT est effectuée avec 500 ng d'une amorce aléatoire pd(N)6 (Pharmacia), 0.5 mM chaque dNTP, 10 mM DTT, 1 U /  $\mu\text{L}$  RNAsin (Pharmacia) et 10 U /  $\mu\text{L}$  de transcriptase inverse M-MLV (GibcoBRL) dans un tampon de RT-PCR 1X (50 mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ ). La réaction est incubée à  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  pendant 1 h et l'enzyme est inactivée en chauffant à  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  pendant 10 min. Les amorces sens et antisens utilisées pour les réactions de PCR, voir Figure 7, ont été choisies sur deux exons séparés d'un intron afin de discriminer une amplification effectuée à partir de l'ADNc (provenant donc de l'ARNm) de celle provenant d'un ADN génomique contaminant. Les conditions d'amplification pour chaque ADNc sont les mêmes :  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  pendant 5 min, suivi de 30 cycles :  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 30 s,  $T_m\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 30 s,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 30 s, et de 10 min à  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Chaque paire d'amorces à un  $T_m\text{ }^{\circ}\text{C}$  particulier et un tampon qui lui est propre, voir Tableau I.

La synthèse d'ADNc par transcriptase inverse à partir de l'ARN extrait des colonies hématopoïétiques est réalisée directement sur le culot d'ARN total car le nombre de cellules au départ est trop petit. À chaque culot d'ARN, 9.5 µL d'un mélange de réaction, contenant 6.1 µL d'eau DEPC, 2 µL de tampon 5X (1<sup>st</sup> strand buffer de GibcoBRL), 0.5 µL de DTT 0.1 mM, 0.2 µL d'amorce oligo dT (1 µg / µL) et 0.2 µL de dNTPs 25 mM chacun, sont ajoutés et incubés pendant 20 à 30 min sans dissoudre avant au moins 20 min. La réaction de transcriptase inverse est débutée en ajoutant 0.5 µL de MMLV (GibcoBRL) à chaque culot et incubé à 40 °C pendant 1 h. L'ADNc synthétisé est précipité avec 5 µL de NH<sub>4</sub>OAc 7.5 M, 0.5 µL de polyacrylamide transporteur et 30 µL d'EtOH 100 % et mélangé pendant 1 min par inversion. Après une centrifugation de 5 min à 13 000 rpm, le culot est lavé avec 150 µL d'EtOH 75 % et séché à l'air libre pendant environ 10 min.

Avant d'amplifier l'ADNc, une réaction de «tailling» (addition de poly-A) est réalisée en ajoutant, à chaque réaction, 5 µL du mélange suivant : 0.4 µL de dATP 100 mM, 1 µL de tampon 5X TdT (500 mM potassium cacodylate pH 7.2, 10 mM CoCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT) (GibcoBRL) et 3.6 µL d'eau DEPC. Après une incubation de 5 à 10 min sans resuspendre, 7.5 U d'enzyme TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) (GibcoBRL) sont ajoutées et le tout resuspendu et incubé à 37 °C pendant 15 min. L'enzyme est inactivé en chauffant à 75 °C pendant 10 min.



Source d'ADNc	Transcrit	Amorces	Séquence 5'-3'	ADNc	ADN
EBs et colonies Ery.	BP1	02-04	gtatggccacctctgtctt	224 pb	224 pb
		02-05	gagtagatggctctcggett		
Souris tg, EBs	BP1	02-08	tggagcctggatcagcatc	417 pb	1 266 pb
		96-5	tggacagcaagaaagcgagc		
EBs	BP1	02-09	ccccaattgtcctactcca	894 pb	1 743 pb
		02-10	gccaccactttctgataggc		
Souris tg, EBs et colonies	$\beta$ -majeur	95-28	ggaccagcgggtactttgatag	239 pb	868 pb
		FR $\phi$ 1	gtggcccagcacaatcacgat		
Souris tg, EBs et colonies	S16	95-15	aggagcgatttgctggtgtgga	104 pb	194 pb
		95-16	gctaccaggcctttgagatgga		

**Figure 7.** Séquence des amorces sens et antisens pour l'analyse de l'expression des transgènes LCR $\beta$ BP1 $\beta$  et  $\beta$ BP1 $\beta$ , de même que pour le gène murin  $\beta$ -majeur et le contrôle interne de la réaction PCR, soit l'ARN ribosomique murin S16.

**Légende de la figure 7 :**

Le schéma montre les positions relatives des amorces sens et antisens alors que le tableau indique la séquence des amorces et la taille attendue des amplifications.



**Tableau I.** T<sub>m</sub> °C et tampons utilisés pour les différentes amplifications spécifiques à chaque paire d'amorces.

Amorces	T <sub>m</sub> °C	Tampon 10X
02-04, 02-05	67	100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl <sub>2</sub> , 0.01 % gélatine
02-08, 96-5	57	100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub>
02-09, 02-10	54	100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub>
95-28, FR $\phi$ 1	60	100 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM KCl, 15 mM MgCl <sub>2</sub>
95-15, 95-16	60	100 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM KCl, 15 mM MgCl <sub>2</sub>

**Légende du tableau I :**

Le tableau présente les différentes conditions de PCR utilisées pour amplifier les transcrits relatifs aux transgènes étudiés, aux gènes de  $\beta$ -majeur et de S16 murins.

Pour l'amplification de l'ADNc, 38.8  $\mu$ L du mélange suivant : 25  $\mu$ L de tampon 2X (20 mM Tris pH 8.8, 100 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>), 2  $\mu$ L d'amorce oligo dT (1  $\mu$ g /  $\mu$ L), 0.5  $\mu$ L de BSA 1 mg / mL, 7.25  $\mu$ L d'eau DEPC, 2  $\mu$ L de dGTP, dCTP, dTTP 25 mM chacun, 1  $\mu$ L de T4 gene 32 protéine (4.15 mg / mL) (Pharmacia) et 1  $\mu$ L de Taq Polymérase (5 U /  $\mu$ L ) (Gibco), sont ajoutés au 5  $\mu$ L d'ADNc-polyA. Le programme d'amplification est le suivant : 94 °C, 1 min; 37 °C, 2 min; 72 °C, 10 min pendant un cycle; suivi de quarante-quatre cycles à 94 °C, 1 min; 55 °C, 2 min; 72 °C, 10 min en terminant à 4 °C. À partir de cette amplification d'ADNc, 2  $\mu$ L sont utilisés pour les réactions de PCR spécifique (voir figure 7 et tableau I) dans un volume de 20  $\mu$ L final.

### 2.5.3 Protection à la RNase

L'analyse de l'expression des souris transgéniques est effectuée par protection à la RNase. L'ARN total extrait du sang des souris transgéniques est hybridé avec une sonde ARN radioactive afin de former un ARN double-brin qui sera révélé sur gel dénaturant. Tout d'abord, la matrice d'ADN linéarisée (1  $\mu\text{g} / \mu\text{L}$ ) est transcrite en sonde ARN, selon la méthode de Melton et al., 1984, en présence de tampon de transcription contenant 50 mM Tris pH 8.0, 6 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM spermidine, 0.02 M de DTT, 32.6 U de RNAsin, 0.5 mM de XTP (A,G,C) chacun, 25  $\mu\text{M}$  UTP, 1.85 MBq  $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ -UTP et 120 U de T3 RNA polymérase dans un volume final de 20  $\mu\text{L}$ . Cette réaction de polymérisation est incubée à 37 °C pendant 1 h afin d'obtenir une incorporation minimale des isotopes à 75 %. La matrice d'ADN est ensuite excisée, afin d'éviter que cette ADN non-marqué hybride avec l'ARN, en incubant ce mélange avec de la DNase I exempte de RNase 10  $\mu\text{g} / \mu\text{L}$  et de la RNAsin 32.6 U à 37 °C pendant 10 min. Après une extraction au phénol pour inhiber les enzymes, la sonde d'ARN est purifiée sur une colonne de Sephadex G-100 (Pharmacia) à l'aide d'un tampon d'élution composé de 10 mM Tris pH 7.0, 1 mM EDTA et de 0.1 % SDS. La fraction récoltée contenant la sonde est précipitée avec un dixième du volume de NaOAc 3 M, de l'ARN de levure 50  $\mu\text{g} / \text{mL}$  et de deux volumes d'EtOH 95 % froid. Chaque échantillon d'ARN (5  $\mu\text{g}$ ) est préalablement séché et la réaction d'hybridation est effectuée à 52 °C pendant 16 h dans une solution de formamide 80 % et d'un tampon d'hybridation (Pipes 40 mM pH 6.8, NaCl 0.4 M, EDTA 1 mM) en présence de 4 ng de sonde ARN, marquée, par échantillon. Après

l'hybridation, l'ARN simple-brin est digéré à 15 °C pendant 2 h dans 300 µL d'un tampon de digestion (10 mM Tris pH 7.5, 5 mM EDTA et 0.3 M NaCl) avec de la RNase A 40 µg / mL et de la RNase T1 2 µg / mL. Cette réaction est arrêtée en incubant 15 min à 37 °C avec 20 µL d'une solution de 10 % SDS et 50 µg de protéinase K. Après une extraction au phénol / chloroforme / isoamyl suivie d'une précipitation de l'ARN double-brin à l'aide d'ARNt de levure, les échantillons sont séchés puis, resuspendus dans une solution de formamide 80 % et de colorant (bleu de bromophénol 0.5 %, bleu de xylène cyanol 0.5 % et de TBE 2.5X). Les échantillons préalablement chauffés à 90 °C pendant 1 min sont soumis à une électrophorèse sur gel d'acrylamide 6 %, 7 M d'urée.

## **2.6 Pathologie**

### **2.6.1 Prélèvement des organes**

Les organes tels que la rate, les reins, le cœur, les poumons, le foie, le cerveau et les os sont prélevés chez des souris transgéniques de même que chez des souris contrôles du même âge afin d'effectuer une analyse morphologique au niveau tissulaire et cellulaire. Les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale. Les poids de la rate et de la souris analysée sont calculés afin de déterminer la présence ou non de splénomégalie chez les souris transgéniques.

### **2.6.2 Fixation**

Les organes prélevés sont fixés 24 h dans une solution de formaline (formaldéhyde 10 % dans du PBS 1X (v/v)) avant d'être utilisés pour faire des coupes histologiques.

# Chapitre 3

## RÉSULTATS

### 3.1 Détermination du rôle de BP1 dans l'érythropoïèse

#### LCR $\beta$ BP1 $\beta$

Afin de déterminer le rôle de BP1 humain dans l'érythropoïèse murine et humaine, nous avons ciblé l'expression de l'ADNc de BP1 humain dans la lignée érythroïde. Nous savons que BP1 est un répresseur *in vitro* du gène de  $\beta$ -globine humain, nous avons donc voulu étudier sa fonction *in vivo* en générant des souris transgéniques qui exprimeraient BP1 dans la lignée érythroïde.

Pour ce faire, nous avons généré une construction contenant l'ADNc de BP1 (1.13 Kb *HindIII-XbaI*) obtenu du Dr Patricia Berg, auquel nous avons lié le promoteur (314 pb) et une région (2.808 Kb) du gène de  $\beta$ -globine humain comprenant la fin de l'exon II, l'intron II, l'exon III, le site de polyadénylation et les régions flanquantes en 3'. Le promoteur, qui est de -264 pb du site d'initiation à la transcription, est tronqué des sites de liaison de BP1 afin d'éviter une auto-inhibition du transgène. La région 3' du gène de  $\beta$ -globine humain est ajoutée en aval de l'ADNc de BP1 afin de permettre une stabilisation du transcrit, un épissage et une expression efficace du transgène. Le LCR (8 Kb Groudine et al., 1989), comprenant les coeurs des sites d'hypersensibilité à la DNase et les régions flanquantes en 5' et 3' ont été ajoutés afin de permettre un haut niveau d'expression indépendant du site d'intégration et dépendant du nombre de copies.

### 3.1.1 Obtention de souris transgéniques

Le transgène LCR $\beta$ BP1 $\beta$ , de 12 Kb, excisé du plasmide p $\beta$ SH- $\beta$ BP1 $\beta$  et purifié a été microinjecté dans 2344 œufs fécondés. La réimplantation a été faite dans 84 femelles pseudo-gestantes (voir Tableau II). Parmi les 121 souriceaux nés et criblés par Southern, une seule souris fondatrice portait le transgène en entier, appelée LCR $\beta$ BP1 $\beta$ -32. Cette fondatrice portait le transgène à environ 1 copie par génome (voir figure 8). Une deuxième souris LCR $\beta$ BP1 $\beta$ -118 était positive pour la présence du transgène, mais celle-ci s'est avérée être déletée du LCR.

La sonde d'ADN ayant servi au criblage Southern des souris LCR $\beta$ BP1 $\beta$  correspond à la construction entière utilisée pour exciser le fragment à microinjecter, soit le plasmide p $\beta$ SH- $\beta$ BP1 $\beta$ .

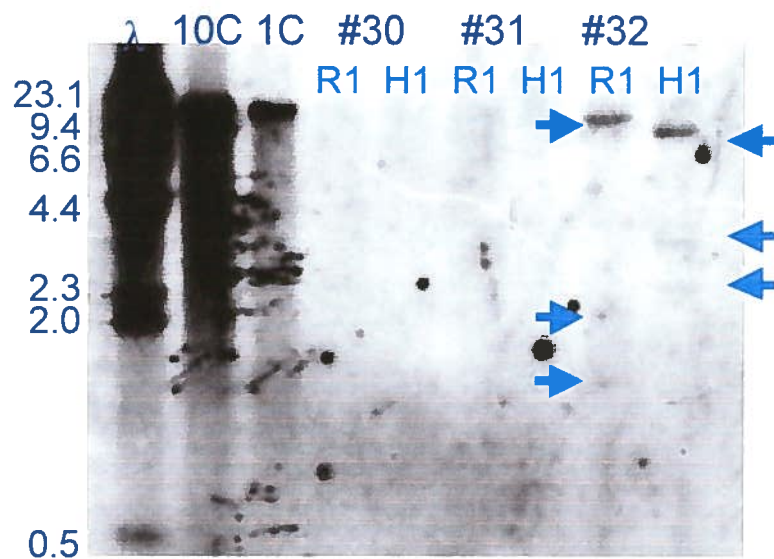
Afin d'obtenir des souris transgéniques de LCR $\beta$ BP1 $\beta$ -32, celle-ci a été accouplée avec un mâle F1 (C57Bl/6 X CBA/J). Parmi les 29 souriceaux criblés par Southern, aucun ne s'est avéré positif pour la présence du transgène. Nous avons aussi accouplé LCR $\beta$ BP1 $\beta$ -32 avec un mâle YAC- $\beta$ -globine, dont le fond génétique (C57Bl/6) est différent de celui du mâle F1 (C57Bl/6 X CBA/J) et sur 47 souriceaux analysés, aucun positif n'a été criblé.

**Tableau II** Résumé de la microinjection du transgène LCR $\beta$ BP1 $\beta$ 

# Journées	# Femelles F1	# œufs $\mu$ injectés	# Transferts	# souriceaux	# souriceaux positifs
37	368	2344	84	121	1

**Légende du Tableau II :**

Ce tableau montre le nombre de journées de microinjection qui ont été réalisées en résumant le nombre de souris utilisées, le nombre d'œufs microinjectés, de transferts et de souriceaux obtenus.

**Figure 8.** Southern LCR $\beta$ BP1 $\beta$ -32.**Légende de la figure 8 :**

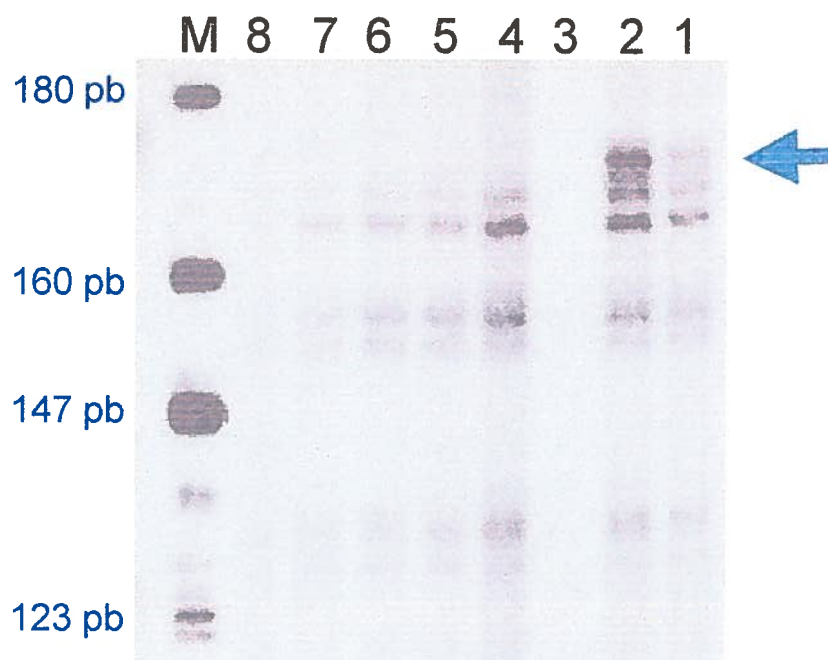
Environ dix  $\mu$ g d'ADN digéré avec Eco R1 (R1) ou bien Bam H1 (H1) a été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose 1 % et transféré sur une membrane de nitrocellulose. Les membranes ont été hybridées avec une sonde spécifique à la construction LCR $\beta$ BP1 $\beta$ . Trois bandes spécifiques sont attendues pour chaque digestion, soit 8.8 Kb, 1.9 Kb et 1.3 Kb pour EcoR1 et 7.1 Kb, 2.8 Kb et 2.1 Kb pour BamH1. Le marqueur utilisé est  $\lambda$  HindIII et les copies (c) correspondent à une et dix copies du transgène. Les trois souris sont issues d'une même portée, soit les 30, 31 et 32<sup>ème</sup> souriceaux analysés.

### 3.1.3 Analyse de l'expression

Afin de vérifier l'expression du transgène chez LCR $\beta$ BP1 $\beta$ -32, deux approches ont été réalisées sur de l'ARN total extrait des réticulocytes présents dans le sang périphérique de la fondatrice, soit la protection à la RNase et le RT-PCR

#### 3.1.3.1 Protection à la RNase

Une sonde antisense a été produite à partir de la construction p $\beta$ SK- $\beta$ BP1 (voir figure 6) afin de vérifier l'expression du transgène LCR $\beta$ BP1 $\beta$  par protection à la RNase. La construction a été linéarisée avec *Pst*I, et l'utilisation de la T3 polymérase a permis de générer une sonde linéaire de 414 pb. La sonde d'ARN nouvellement synthétisée protège l'ARNm du site d'initiation de la transcription du promoteur de  $\beta$ -globine et 129 pb de l'ADNc de BP1 pour un total de 179 pb protégé. Sur la figure 9, on peut voir que l'ARN total extrait du sang périphérique de LCR $\beta$ BP1 $\beta$ -32, contient l'ARNm correspondant au transgène par la présence d'un hybride d'ARN à la hauteur attendue. Cet hybride est spécifique à la présence du transgène car on constate son absence dans le sang d'une souris contrôle (mâle F1 (C57Bl/6 X CBA/J)). Des difficultés à générer une sonde radioactive pleine longueur et des problèmes d'hybridation, ont malheureusement empêché de reproduire ce résultat une deuxième fois.



**Figure 9.** Protection à la RNase sur la fondatrice LCR $\beta$ BP1 $\beta$ -32

**Légende de la figure 9 :**

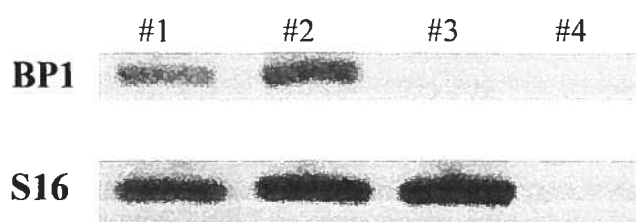
L'ARN a été extrait des réticulocytes présents dans le sang périphérique et hybridé avec une sonde ribonucléique marquée au  $^{32}\text{P}$  couvrant l'ARNm du site d'initiation de la transcription du promoteur de  $\beta$ -globine jusqu'à 129 pb de l'ADNc de BP1. Le fragment protégé correspond donc à 179 pb. Dans la travée 1 : ARN de la fondatrice LCR $\beta$ BP1 $\beta$ -32; travée 2 : ARN d'une souris de la lignée  $\beta$ BP1 $\beta$ 43 (non pertinent sur cette figure); travée 3 : puits vide; travée 4 à 6 : ARN de cellules K562 induites (voir BP1 endogène à 129 pb), 1  $\mu\text{g}$ , 300 ng et 100 ng, respectivement ; travée 7 : ARN d'un contrôle négatif F1; travée 8 : contrôle négatif avec de l'ARNt de levure. M : marqueur.

### 3.1.3.2 RT-PCR

Afin de s'assurer de l'expression du transgène de LCR $\beta$ BP1 $\beta$ -32, dans le sang périphérique, un essai de RT-PCR a été élaboré (chapitre 2, section 2.5.2). Un fragment amplifié de 417 pb est observé dans la travée #1 (voir figure 10). Ce fragment est spécifique au transgène, correspond à la taille attendue, et a été séquencé afin de s'assurer de l'intégrité du messenger transcrit. Un autre messenger



avec les oligos 02-09 et 02-10 a été observé et séquencé (résultats non montrés, voir discussion). Cet autre messager correspond à un épissage aberrant du transgène entre l'exon 3 de  $\beta$ -globine et le 160<sup>e</sup> acide aminé de l'ADNc de BP1. Cet épissage produit un messager tronqué de 80 acides aminés de BP1 et des 19 nucléotides de l'exon 2 de  $\beta$ -globine.



**Figure 10.** Analyse de l'expression du transgène LCR $\beta$ BP1 $\beta$ .

**Légende de la figure 10 :**

L'ADNc de chaque échantillon a été synthétisé à partir de 1  $\mu$ g d'ARN de réticulocytes présents dans le sang périphérique. Un soixantième du produit de RT a été amplifié par PCR avec les amorces 02-08 et 96-5 pour le transcrit du transgène et les amorces 95-15 et 95-16 pour le contrôle interne : l'ARN ribosomique S16. Ces deux réactions ont été faites dans des tubes différents à partir de la même dilution. Un aliquot de 10  $\mu$ L de chaque échantillon a été soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 8 %. Dans la travée 1 : l'ADNc de LCR $\beta$ BP1 $\beta$ -32; travée 2 : l'ADNc d'une souris provenant de la lignée  $\beta$ BP1 $\beta$ 43 (non pertinent sur cette photo); travée 3 : l'ADNc d'une souris négative F1 et dans la travée 4 : contrôle négatif où il n'y a pas de matrice d'ADNc.

### 3.1.4 Pathologie

LCR $\beta$ BP1 $\beta$ -32 est décédée âgée de 18 mois. Nous avons quantifié la cellularité de la moelle osseuse en comptant le nombre de cellules présents dans un fémur. Pour LCR $\beta$ BP1 $\beta$ -32, la cellularité est près de deux fois plus élevée que chez deux souris contrôles (F1) du même âge. Nous avons obtenu  $8 \times 10^7$  cellules pour LCR $\beta$ BP1 $\beta$ -32 et 4.8 et  $5.2 \times 10^7$  cellules pour les contrôles F1. Tous les

organes, tels que la rate, les reins, le foie, le poumon, le coeur et le cerveau ont été prélevés et fixés (chapitre 2, section 2.7.2). La splénomégalie a été déterminée par morphométrie à partir des coupes histologiques de rate de LCR $\beta$ BP1 $\beta$ -32 et de deux souris contrôles F1. On peut voir sur la figure 11a, que la rate de LCR $\beta$ BP1 $\beta$ -32 est plus de 2X plus grosse que celle des souris contrôles. De plus, la rate de LCR $\beta$ BP1 $\beta$ -32 démontre une désorganisation au niveau de la pulpe rouge et de la pulpe blanche causée par une expansion de la pulpe rouge. On peut aussi observer plusieurs foyers d'érythropoïèse comparativement à la rate d'une souris contrôle du même âge (voir figure 11b).

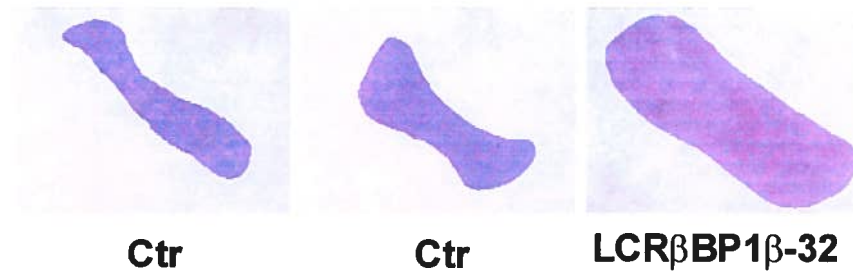


Figure 11a

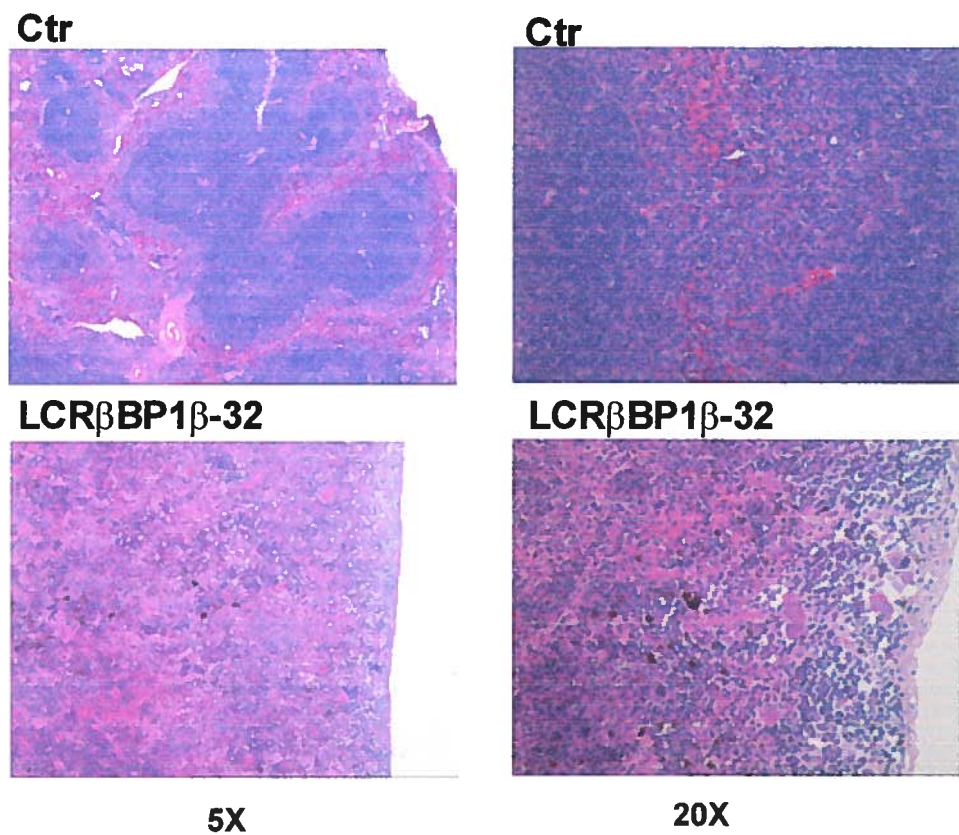


Figure 11b

**Figure 11a et 11b.** Coupe histologique de la rate de LCRβBP1β-32

**Légende de la figure 11a et 11b :**

Cette figure montre des coupes histologiques de rate de souris contrôles négatives et de la fondatrice LCRβBP1β-32 colorées à l'hématoxyline et éosine. En 11a, le grossissement est de 1.6X.

### 3.2 Élaboration du rôle de BP1 humain dans l'érythropoïèse murine *in vitro*

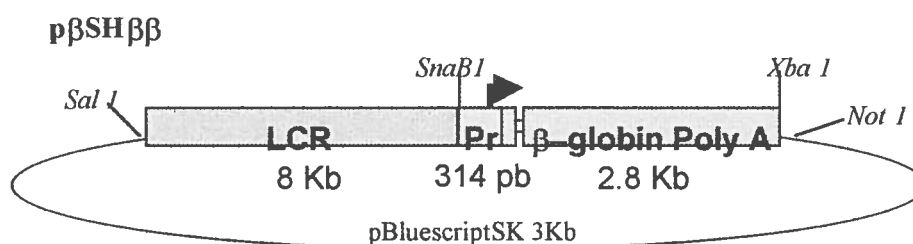
Les résultats obtenus avec la microinjection de la construction LCR $\beta$ BP1 $\beta$  suggèrent deux hypothèses : premièrement, que la souris fondatrice LCR $\beta$ BP1 $\beta$ -32 est très mosaïque, ce qui fait qu'elle ne transmet pas le transgène et/ou deuxièmement, que la présence du transgène BP1 humain cause une létalité *in utero* en affectant l'érythropoïèse murine. Nous avons voulu vérifier cette deuxième hypothèse en utilisant les cellules ES comme modèle de différenciation hématopoïétique murine.

Pour ce faire, nous avons généré des transfectants stables exprimant BP1 avec la même construction que pour la génération des souris transgéniques, soit p $\beta$ SH- $\beta$ BP1 $\beta$  (15 Kb). Nous avons aussi généré des transfectants stables avec une construction contrôle sans l'ADNc de BP1 afin d'associer les phénotypes obtenus à la présence de BP1 et non à un effet de la transfection.

#### 3.2.1 Constructions

Afin d'obtenir la construction contrôle, nous avons effectué les mêmes étapes que pour la construction p $\beta$ SH- $\beta$ BP1 $\beta$ . Pour ce faire, le plasmide pGEM5- $\beta$ glSE a été digéré par *NcoI* et *BamHI* (428 pb en moins) et les extrémités rendues franches par la Klenow ont été refermées sur elles-mêmes, nommé pGEM5- $\beta$ . Afin d'exciser le promoteur tronqué et l'extrémité en 3' de  $\beta$ -globine, la même digestion, soit *SnaBI* et *XbaI* a été utilisée. Le fragment excisé ( $\beta$ ) de 3.122 Kb, dont les extrémités ont été rendues franches, a été lié au plasmide pU $\beta$ SH (11 Kb)

contenant le LCR, digéré avec *EcoRI* et traité à la Klenow (la même préparation que pour la première construction). La construction finale a été séquencée et nommée p $\beta$ SH- $\beta\beta$  (14 Kb) (voir figure 12).



**Figure 12.** Schéma de la construction contrôle p $\beta$ SH $\beta\beta$  utilisée pour l'électroporation avec p $\beta$ SH $\beta$ BP1 $\beta$  afin de générer les transfectants stables.

**Légende de la figure 12 :**

La construction p $\beta$ SH $\beta\beta$  est représentée sous la forme du plasmide final.

### 3.2.2 Génération des transfectants stables

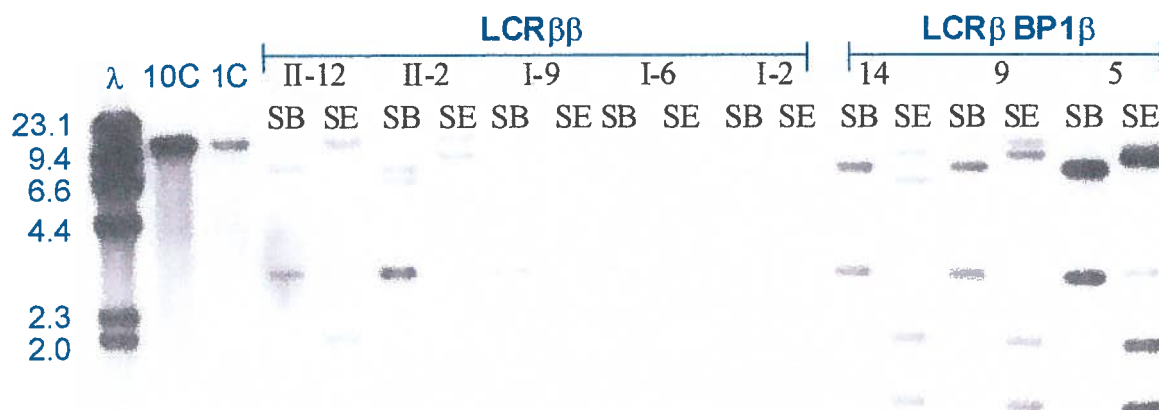
Afin de générer des transfectants stables, les constructions générées (p $\beta$ SH- $\beta$ BP1 $\beta$  et p $\beta$ SH- $\beta\beta$ ) ont été électroporées en cotransfection avec un plasmide pSV3néo, qui permet la résistance au G-418, dans des cellules ES CCE (Gordon Keller) (chapitre 2 section 2.3.3). Après le 12<sup>e</sup> jour de sélection au G-418 des transfectants stables, 51 clones ont été repiqués à l'aide de buvards trypsinisés. Pour la construction p $\beta$ SH- $\beta$ BP1 $\beta$ , 14 clones stables ont été obtenus et leur culture a été poursuivie pour la congélation et les analyses Southern. Pour la construction contrôle, 37 clones stables ont été obtenus et cultivés. Les clones stables ont été gardés en congelant à  $-80^{\circ}\text{C}$  un pétri confluent de 10 cm alors qu'un deuxième pétri a été utilisé pour effectuer les analyses génotypiques par transfert Southern.

### 3.2.3 Analyse de l'intégrité du transgène des transfectants stables par Southern

Comme les transfectants stables ont été générés avec des constructions circulaires, ils doivent être bien génotypés pour la présence entière du transgène. Après criblage par transfert Southern, trois transfectants LCR $\beta$ BP1 $\beta$  (clones # 5, 9 et 14) et quatre transfectants LCR $\beta\beta$  (clones # I-2, I-9, II-2 et II-12) sur les cinquante et un clones analysés, ont été utilisés pour les analyses futures (voir figure 13). Afin de s'assurer de l'intégrité, deux digestions diagnostiques, *SalI* / *Eco RI* et *SalI* / *Bam HI*, ont été utilisées. La sonde d'ADN linéaire utilisée pour le criblage provient du plasmide pGEM5- $\beta$ BP1 $\beta$   $\Delta$ *NcoI* digéré avec *AccI*, générant ainsi une sonde de 3.145 Kb couvrant le promoteur de  $\beta$ -globine, l'ADNc de BP1 et la partie 3' de  $\beta$ -globine.

Les bandes attendues pour la digestion *SalI* / *Eco RI* sont : pour LCR $\beta$ BP1 $\beta$  de 8.8, 1.771 et 1.449 Kb et pour LCR $\beta\beta$  de 9.349 et 1.771 Kb, alors que pour la digestion *SalI* / *Bam HI* : pour LCR $\beta$ BP1 $\beta$  de 7.174 et 2.808 Kb et pour LCR $\beta\beta$  de 6.1 et 2.808 Kb. Par l'analyse des jonctions des transgènes, le type d'intégration de ces clones semblent en être une de type tête-à-queue.

Une évaluation approximative du nombre de copies des transgènes a été établie pour chaque clone stable en comparant l'intensité du signal par rapport aux contrôles positifs (une et dix copies du transgène). Selon cette évaluation, les clones 5, 9 et 14 portent respectivement cinq, une et deux copies alors que les clones I-2, I-9, II-2 et II-12 semblent avoir respectivement une, une, deux et deux copies.



**Figure 13.** Analyse d'un transfert Southern des transfectants stables.

**Légende de la figure 13:**

Environ dix  $\mu\text{g}$  d'ADN digéré avec *Sall* et *Eco RI* (SE) ou bien *Sall* et *Bam HI* (SB) a été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose 1 % et transféré sur une membrane de nitrocellulose. Les membranes ont été hybridées avec une sonde spécifique aux constructions  $\text{LCR}\beta\text{BP1}\beta$  et  $\text{LCR}\beta\beta$ . Le marqueur utilisé est  $\lambda$  *HindIII* et les copies (c) correspondent à une et dix copies du transgène / génome.

### 3.2.4 Différenciation et expression

Afin d'évaluer le rôle de BP1 sur l'érythropoïèse murine, les transfectants stables et les cellules ES CCE non transfectées ont été utilisés pour les différencier en corps embryonnaires et en colonies hématopoïétiques. L'hémoglobinisation des corps embryonnaires, la formation de colonies érythroïdes primitives et définitives, de même que l'expression de BP1 ont été mesurés afin de définir le rôle de BP1 sur l'érythropoïèse murine *in vitro*.

#### 3.2.4.1 Différenciation en corps embryonnaires

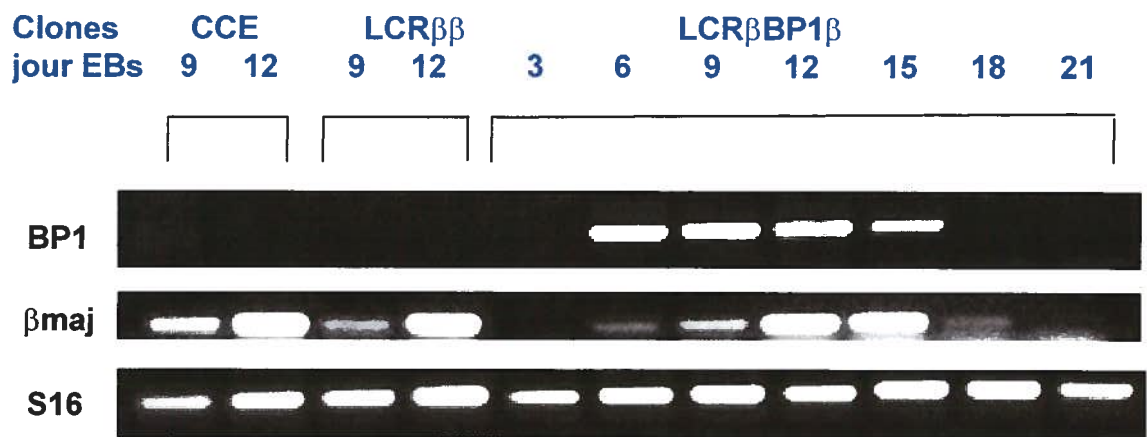
La différenciation en corps embryonnaires a été effectuée lors de deux expériences indépendantes sur les cellules ES CCE, les trois clones stables

LCR $\beta$ BP1 $\beta$  (5, 9 et 14) et trois clones stables LCR $\beta\beta$ , soit I-2, I-9 et II-12, (chapitre 2 section 2.3.5).

L'expression du transgène LCR $\beta$ BP1 $\beta$  a d'abord été évaluée à partir des corps embryonnaires différenciés sur plusieurs jours. Par RT-PCR, l'expression de BP1 a été détectée dans les corps embryonnaires du jour 6 au jour 15 (voir figure 14). Ce profil d'expression ressemble à celui du gène endogène de  $\beta$ -majeur, qui apparaît au jour 6, augmente jusqu'au jour 12 pour diminuer après le jour 15. Les cellules ES CCE non transfectées et les clones stables LCR $\beta\beta$  n'expriment pas BP1 à aucun jour de la différenciation alors que l'on peut observer que l'expression de  $\beta$ -majeur augmente aussi pour ces clones entre les jours 9 et 12.

Comme le transgène BP1 est exprimé dans les corps embryonnaires, son effet sur l'hémoglobinisisation de ceux-ci a été mesuré. L'hémoglobinisisation des corps embryonnaires débutent au jour 5 de différenciation mais celle-ci est trop faible pour effectuer un décompte des corps hémoglobinisés sur ceux non-hémoglobinisés. Durant la cinétique de différenciation des corps embryonnaires, l'hémoglobinisisation des différents transfectants et des cellules ES sauvages varie entre 47 % et 72 % pour les jours 6 et 9 de différenciation (voir tableau III). L'hémoglobinisisation des corps embryonnaires aux jours 7, 8, 12, 13, 15 et 18 a aussi été dénombrée et la même variation entre les transfectants a été observée (résultats non-montrés). Par contre, aucune différence significative de l'hémoglobinisisation des corps embryonnaires n'a été observée entre les clones stables LCR $\beta$ BP1 $\beta$  et les clones LCR $\beta\beta$ .





**Figure 14.** Analyse de l'expression du transgène LCR $\beta$ BP1 $\beta$  par PCR.

**Légende de la figure 14:**

L'ADNc de chaque échantillon a été synthétisé à partir de 1  $\mu$ g d'ARN extrait des corps embryonnaires à différent jour de différenciation. Un vingtième de la réaction de RT a été amplifié par PCR avec les amorces 02-09 et 02-10 pour le transgène LCR $\beta$ BP1 $\beta$ , les amorces 95-28 et FR $\phi$ 1 pour  $\beta$ -majeur et les amorces 95-15 et 95-16 pour S16 (voir tableau I). Un aliquot de 10  $\mu$ l de chaque échantillon a été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose 1 %.

**Tableau III : Hémogloblinisation des corps embryonnaires**

<b>Sauvage ou clones stables</b>	<b>Jour 6 EBs hémoglobinisés %</b>	<b>Jour 9 EBs hémoglobinisés %</b>
Sauvage	55.2 ± 2.3	62.6 ± 5.9
LCRβBP1β 5	66.3 ± 4.0	71.4 ± 9.5
LCRβBP1β 9	52.3 ± 1.8	60.7 ± 8.5
LCRβBP1β 14	53.4 ± 1.4	49.6 ± 33.1
LCRββ I-2	68.9 ± 4.9	62.6 ± 5.9
LCRββ I-9	52.4 ± 2.5	46.8 ± 16.5
LCRββ II-12	54.5 ± 0.8	85.2

**Légende du tableau III :**

Le tableau nous montre le pourcentage des corps embryonnaires hémoglobinisés par rapport à ceux non-hémoglobinisés lors de deux expériences indépendantes pour les six clones stables différenciés et les cellules ES non transfectées (sauvage).

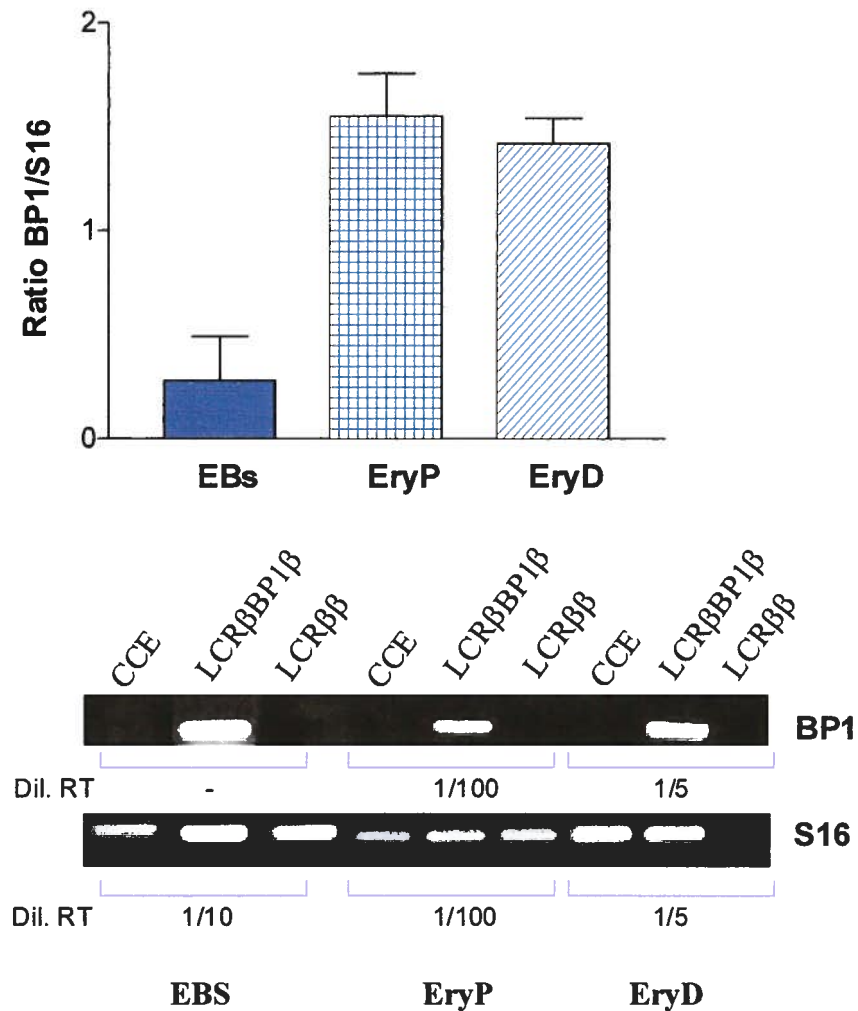
**3.2.4.2 Différenciation en colonies hématopoïétiques**

Comme les corps embryonnaires représentent une population mixte de cellules, la différenciation de ceux-ci en colonies hématopoïétiques nous permet d'évaluer plus certainement le rôle de BP1 dans l'érythropoïèse murine. Les mêmes clones stables (LCRβBP1β 5, 9 et 14 et LCRββ I-2, I-9 et II-12) ont été différenciés en colonies hématopoïétiques à partir des corps embryonnaires des jours 7 et 10 (chapitre 2 section 2.3.6).

L'expression du transgène BP1 a été mesuré dans les colonies érythroïdes primitives et dans les colonies érythroïdes définitives qui ont été prélevées des cultures de méthylcellulose. En comparaison avec l'expression du transgène dans les corps embryonnaires, l'expression de BP1 dans les colonies érythroïdes primitives et définitives est augmentée d'un facteur 2 à 3, normalisé avec le contrôle interne d'ARNr S16 (voir figure 15). Cependant, tout comme pour les

corps embryonnaires, BP1 n'est pas exprimé dans les colonies érythroïdes primitives et définitives des cellules ES CCE et des clones stables LCR $\beta\beta$ .

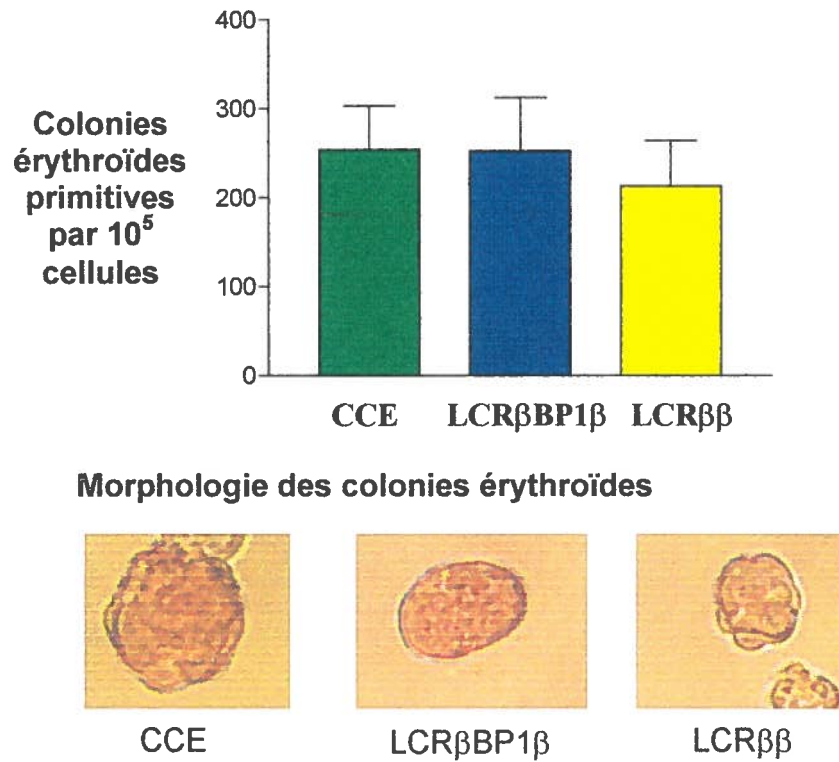
Comme BP1 est exprimé dans les colonies érythroïdes primitives et définitives pour les clones stables LCR $\beta$ BP1 $\beta$  et non pour les clones stables LCR $\beta\beta$ , il est possible d'évaluer son rôle en comparant le nombre de colonies érythroïdes obtenues. La différenciation en colonies hématopoïétiques a été réalisée deux fois, lors de deux expériences indépendantes avec les mêmes clones qu'au départ. Même si BP1 est exprimé dans les colonies érythroïdes primitives provenant des corps embryonnaires de jour 7, le nombre de colonies observées en culture n'est pas affecté en comparaison aux cellules ES CCE et aux clones stables LCR $\beta\beta$  (Test statistique de Student,  $p > 0.5$ ) (voir figure 16). L'efficacité d'ensemencement et la morphologie des colonies érythroïdes primitives sont semblables pour tous les clones comparativement aux ES CCE. Par contre, pour les colonies érythroïdes définitives provenant des corps embryonnaires de jour 7, le nombre de colonies est significativement diminué par rapport aux cellules ES CCE ( $p < 0.02$ ) et aux clones stables LCR $\beta\beta$  ( $p < 0.01$ ) (voir figure 17). L'efficacité d'ensemencement est la même pour tous les clones et les ES CCE et le nombre de colonies macrophages, mixtes et érythroïdes définitives/macrophages n'est pas affecté par le transgène BP1. Lorsque l'on a différencié les colonies érythroïdes définitives à partir des corps embryonnaires de jour 10 traités à la collagénase, la réduction du nombre de colonies observées a été moins significative (résultats non montré).



**Figure 15.** Analyse de l'expression du transgène LCRβBP1β par PCR

**Légende de la figure 15:**

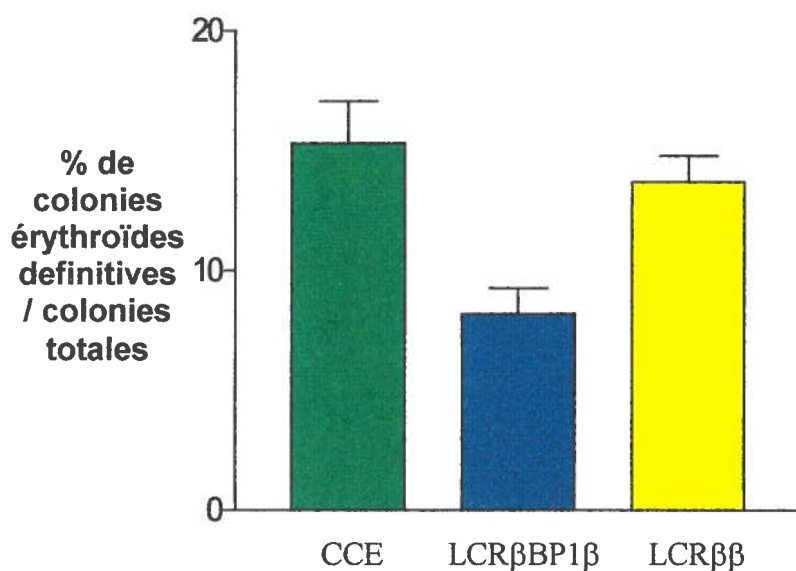
L'ADNc a été synthétisé à partir de 1 µg d'ARN extrait des corps embryonnaires à différent jour de différenciation et des colonies érythroïdes primitives au jour 3. Pour les colonies érythroïdes définitives, la réaction de RT a été faite directement sur le culot d'ARN obtenu. Les réactions de RT ont été amplifiées par PCR selon les dilutions inscrites sur la figure avec les amorces 02-09 / 02-10 et 02-04 / 02-05 pour le transgène BP1 et 95-15 / 95-16 pour le contrôle interne, l'ARN ribosomique S16 (voir tableau I). Un aliquot de 10 µL de chaque échantillon a été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose 1 %.



**Figure 16.** Graphique du nombre de colonies érythroïdes primitives et morphologie

**Légende de la figure 16:**

Le nombre de colonies érythroïdes primitives a été déterminé dans deux expériences indépendantes en comparant les clones LCR $\beta$ BP1 $\beta$  avec les cellules ES CCE et les clones LCR $\beta\beta$ . Le nombre total de cellules mis en culture est  $1 \times 10^5$  cellules provenant des corps embryonnaires de jour 7. Le grossissement des colonies n'est pas le même pour chacune. Analyses statistiques (Test de Student) non significatives  $p > 0.5$ .



#### Morphologie des colonies érythroïdes définitives



**Figure 17.** Graphique du nombre de colonies érythroïdes définitives et morphologie

#### Légende de la figure 17:

Le nombre de colonies érythroïdes définitives a été déterminé dans deux expériences indépendantes en comparant les clones LCRβBP1β avec les cellules ES CCE et les clones LCRββ. Le nombre total de cellules mis en culture est  $1 \times 10^5$  cellules provenant des corps embryonnaires de jour 7. L'efficacité d'ensemencement est la même pour tous les clones et les CCE et le nombre de colonies macrophages, mixtes et érythroïdes/macrophages n'est pas affecté par le transgène BP1. Analyses statistiques significatives (Test de Student)  $p < 0.02$  comparativement aux CCE et  $p < 0.01$  comparativement aux LCRββ.

### 3.3 Élaboration du rôle de BP1 humain dans l'érythropoïèse murine *in vivo*

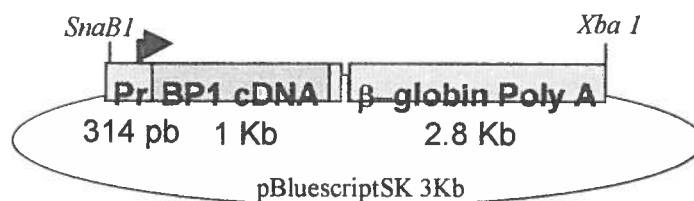
Les résultats obtenus *in vitro* sur le rôle de BP1 humain dans l'érythropoïèse murine, soutiennent l'hypothèse de létalité *in utero* des souris transgéniques LCR $\beta$ BP1 $\beta$ . Afin d'étudier le rôle de BP1 dans l'érythropoïèse murine *in vivo* nous avons généré des souris qui expriment l'ADNc de BP1 dans la lignée érythroïde au stade adulte à des niveaux comparable aux facteurs de transcription tout en étant viable. Pour ce faire, nous avons utilisé la même construction que celle de départ, c'est-à-dire LCR $\beta$ BP1 $\beta$ , mais déletée du LCR. Puisque le LCR permet de hauts niveaux d'expression, sa délétion devrait donc entraîner des niveaux d'expression plus faibles et, potentiellement, permettre la génération de souris transgéniques exprimant BP1 au stade adulte.

#### 3.3.1 Génération de souris transgéniques

La construction utilisée dérive de la première LCR $\beta$ BP1 $\beta$  (voir section 3.1.1 et figure 7). Comme nous ne voulions pas le LCR, nous avons excisé l'ADNc de BP1 avec le promoteur tronqué et la région en 3' de  $\beta$ -globine humaine du plasmide pGEM5- $\beta$ BP1 $\beta$   $\Delta$ NcoI en utilisant les enzymes *Sna*BI et *Xba*I (4.082 Kb). Le promoteur tronqué et la région en 3' de  $\beta$ -globine ont été utilisés pour les mêmes raisons que la première construction LCR $\beta$ BP1 $\beta$ . Ce fragment d'environ 4 Kb correspond à la construction  $\beta$ BP1 $\beta$  utilisée pour générer les souris transgéniques. Cette construction linéaire (voir figure 18) a été purifiée avant d'être microinjectée.

Après quelques journées de microinjection, 12 souris fondatrices sur 93 souriceaux criblés ont été générés pour une efficacité de microinjection de 13 %.

**pGEM5-  $\beta$ BP1  $\Delta$ NCOI**



**Figure 18.** Schéma de la construction pGEM5- $\beta$ BP1 $\Delta$ NCOI utilisée pour la microinjection

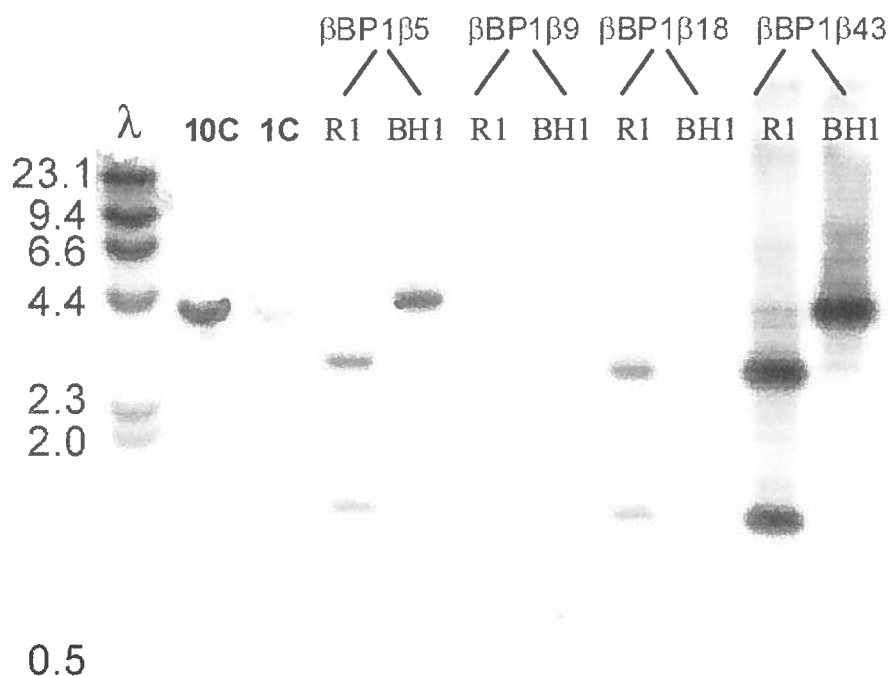
**Légende de la figure 18:**

La construction pGEM5- $\beta$ BP1 $\Delta$ NCOI est représentée sous la forme du plasmide final obtenu. Le transgène à microinjecter  $\beta$ BP1 $\beta$  sera excisé de pGEM5-BP1 $\beta$   $\Delta$ NcoI avec *Sna BI* et *Xba I*.

### 3.3.2 Criblage des souris pour l'intégrité du transgène par transfert Southern

Les souris fondatrices positives de même que leur progéniture ont été criblées par transfert Southern afin de vérifier la présence et l'intégrité du transgène. La sonde utilisée couvre tout le transgène et avec une digestion diagnostique telle que *Eco RI*, on attend deux bandes de 2,5 et 1,4 Kb. Si le transgène s'est intégré de manière tête-à-queue, avec une digestion *BamHI* on attend une bande à 4 Kb étant donné que *BamHI* ne coupe qu'une seule fois le transgène (voir figure 19).





**Figure 19.** Analyse d'un transfert Southern des fondatrices  $\beta$ BP1.

**Légende de la figure 19:**

Environ dix  $\mu$ g d'ADN digéré avec *Eco RI* (R1) ou bien *Bam HI* (BH1) ont été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose 1 % et transféré sur une membrane de nitrocellulose. Les membranes ont été hybridées avec une sonde spécifique à la construction  $\beta$ BP1 $\beta$ . Le marqueur utilisé est  $\lambda$  *HindIII* et les copies (c) correspondent à une et dix copies du transgène. L'analyse montrée ici ne représente que quatre fondatrices, soit les numéros 5, 9, 18 et 43.

Une évaluation approximative du nombre de copies du transgène de chaque fondatrice a été faite et parmi les 12 fondatrices, le nombre de copies varie de 1 à plus de 35 copies (voir tableau IV). Toutes les fondatrices ont un type d'intégration tête-à-queue. Chaque fondatrice n'a qu'une seule intégration exceptée pour la lignée  $\beta$ BP1 $\beta$ 43 qui a deux intégrations différentes. L'analyse de la progéniture de  $\beta$ BP1 $\beta$ 43 nous a montré deux types de jonctions différentes

(résultats non montrés), chacune des intégrations a donc été considérée comme une lignée différente, soit la 43A, la 43B et la combinaison des deux soit la 43AB.

**Tableau IV.** Caractérisation des fondatrices portant le transgène  $\beta$ BP1 $\beta$

Lignée $\beta$ BP1 $\beta$	# de copies	Transmission	Évaluation relative de l'expression
5	8-10	15/80 (19 %)	N.D.
9	2	3/9 (33 %)	N.D.
18	4-5	0/60 (0 %)	+
43	30	25/55 (45 %)	+++
52	5-7	5/11 (45 %)	N.D.
53	5	DCD 10 semaines	+
59	12-15	24/37 (65 %)	+
69	1	11/39 (28 %)	N.D.
80	35-40	4/15 (27 %)	+++
81	5-7	15/38 (39 %)	+
83	5	12/24 (50 %)	++
90	10	0/45 (0 %)	

**Légende du tableau IV:**

Le nombre de copies est évalué en comparant l'intensité du signal avec des contrôles de une et dix copies du transgène lors de l'analyse Southern. La transmission de chacune des fondatrices a été déterminée à partir d'un croisement avec des souris F1 et l'évaluation de l'expression a été faite (voir figure 20) en comparant des souris transgéniques des lignées entre elles (exception de 18, 53 et 90 qui reflète l'expression observée chez la fondatrice. N.D. non détectable

### 3.3.3 Analyse de l'expression du transgène $\beta$ BP1 $\beta$

Afin de détecter l'expression du transgène  $\beta$ BP1 $\beta$ , deux méthodes ont été employées, soient la protection à la RNase et le RT-PCR. Cette expression a été mesurée à partir de l'ARN total extrait des réticulocytes du sang périphérique et à partir des cellules de la moelle osseuse des souris transgéniques de chacune des lignées générées. À l'exception des souris fondatrices  $\beta$ BP1 $\beta$ -18 et  $\beta$ BP1 $\beta$ -53 où

l'ARN a été extrait de celle-ci et de la fondatrice  $\beta\text{BP1}\beta$ -90 qui est décédée avant les analyses d'expression.

### 3.3.3.1 RT-PCR

Afin de s'assurer de l'expression du transgène  $\beta\text{BP1}\beta$ , dans le sang périphérique et dans la moelle osseuse, un essai de RT-PCR a été élaboré (chapitre 2, section 2.5.2). Un fragment de 417 pb est observé dans le sang périphérique pour les lignées 43, 59, 80, 81, 83 et pour les fondatrices 18 (voir figure 20a) et 53 (non montré). Pour les lignées 5, 9, 52 et 69 aucun transcrit n'a été observé à partir de l'ARN extrait du sang périphérique (résultats non montrés mais voir tableau IV pour l'évaluation relative de l'expression). La suite des analyses s'est faite avec les lignées ayant différents niveaux d'expression, soient les 43, 59, 80, 81, 83 et la fondatrice 18. Avec ces lignées, la même réaction de RT-PCR a été faite sur l'ARN des cellules de la moelle osseuse afin de comparer les niveaux d'expression à ceux observés dans le sang périphérique (voir figure 20b).

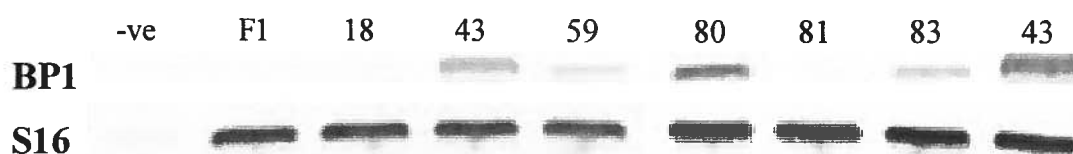


Figure 20a Sang périphérique

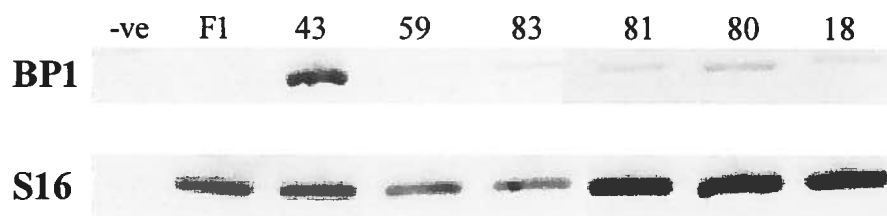


Figure 20b Moelle osseuse

**Figure 20.** Analyse de l'expression du transgène  $\beta$ BP1 $\beta$ **Légende de la figure 20:**

L'ADNc de chaque échantillon a été synthétisé à partir de 1  $\mu$ g d'ARN extrait des réticulocytes ou des cellules de la moelle osseuse. Un soixantième de la réaction de RT a été amplifié par PCR avec les amorces 02-08 et 96-5 pour le transgène et 95-15 et 95-16 pour le contrôle interne d'ARN ribosomique S16. Un aliquot de 10  $\mu$ L de chaque échantillon a été soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 8 %. En 20a : contrôle négatif où il n'y a pas de matrice d'ADN ; F1 : contrôle d'une souris négative; l'ADNc de la fondatrice 18; l'ADNc des lignées 43, 59, 80, 81, 83 et 43 respectivement. En 20b : contrôle négatif où il n'y a pas de matrice d'ADN ; F1 : contrôle d'une souris négative ; l'ADNc des lignées 43, 59, 83, 81 et 80 respectivement; l'ADNc de la fondatrice 18.

### 3.3.3.2 Protection à la RNase

Afin de pouvoir quantifier les différents niveaux d'expression obtenus par RT-PCR, un essai de protection à la RNase a été utilisé. Une sonde antisense a été produite à partir d'un plasmide 3'  $\beta$ -globine humain afin de quantifier le transgène  $\beta$ BP1 $\beta$ . Ce plasmide 3'  $\beta$ -globine humain permet de protéger l'exon 3 de  $\beta$ -globine humaine compris dans la construction  $\beta$ BP1 $\beta$ . Le fragment protégé est de 212 nucléotides et est spécifique au transgène. Le plasmide a été linéarisé avec *Eco RI*, et l'utilisation de la SP6 polymérase a permis de générer une ribosonde linéaire marquée au  $^{32}\text{P}$  de 700 pb. L'essai a été réalisé sur les ARN extraits du sang périphérique et de la moelle osseuse et dans les deux cas, seule la lignée  $\beta$ BP1 $\beta$ 43, dont le niveau d'expression semble le plus fort en RT-PCR, donne clairement un signal d'un fragment protégé, les lignées  $\beta$ BP1 $\beta$  80 et  $\beta$ BP1 $\beta$ 83 ont un faible signal alors que le fragment protégé n'apparaît pas pour les autres lignées (résultats non montrés).

### 3.3.4 Analyse des paramètres hématologiques

Afin de vérifier que l'expression de BP1 humain chez la souris affecte l'érythropoïèse, une analyse des paramètres hématologiques a été réalisée. Pour la lignée exprimant le plus fortement BP1, soit la lignée 43 et une lignée intermédiaire, la lignée 83, le nombre de globules rouges (RBC), la quantité d'hémoglobine (HGB) et l'hématocrite (HCT) sont diminués de manière significative alors que le pourcentage de globules microcytiques (% Micro) est augmenté aussi de manière significative en comparaison avec des souris contrôles

négatives du même âge (voir tableau V). Pour la lignée 43 ayant la plus forte expression, le nombre de plaquettes (PLT) est significativement diminué alors que la distribution des plaquettes (PDW) est augmentée en comparaison avec des souris contrôles négatives du même âge (voir tableau VI). Pour les lignées analysées, certains paramètres hématologiques n'ont pas changé de manière significative, tels que le nombre de globules blancs, le pourcentage de réticulocytes (% Rétic).

**Tableau V.** Paramètres hématologiques des lignées  $\beta\text{BP1}\beta$

Lignée	Nb	Âge	RBC	HGB	HCT	% Micro	% Rétic
<b>Ctrl</b>	6	8-10 mois	10.10 $\pm$ 0.18	15.6 $\pm$ 0.3	50.5 $\pm$ 2.0	0.1 $\pm$ 0.0	2.7 $\pm$ 0.2
<b>43</b>	5	9-11 mois	7.98 $\pm$ 2.47 <b>p&lt;0.1</b>	12.5 $\pm$ 2.7 <b>p&lt;0.05</b>	41.2 $\pm$ 8.5 <b>p&lt;0.05</b>	0.5 $\pm$ 0.1 <b>p&lt;0.001</b>	5.5 $\pm$ 5.0 <b>p&lt;0.5</b>
<b>59</b>	5	8 mois	9.99 $\pm$ 0.25 <b>p&lt;0.5</b>	15.1 $\pm$ 0.5 <b>p&lt;0.1</b>	49.0 $\pm$ 1.6 <b>p&lt;0.5</b>	0.2 $\pm$ 0.1 <b>p&lt;0.1</b>	2.4 $\pm$ 0.4 <b>p&lt;0.5</b>
<b>83</b>	3	9-10 mois	9.62 $\pm$ 0.23 <b>p&lt;0.01</b>	14.4 $\pm$ 0.2 <b>p&lt;0.001</b>	46.6 $\pm$ 1.1 <b>p&lt;0.01</b>	0.3 $\pm$ 0.2 <b>p&lt;0.1</b>	2.3 $\pm$ 0.6 <b>p&lt;0.5</b>
<b>Ctrl</b>	1	13 mois	10.3	15.6	52.3	0.2	2.0
<b>18</b>	1 (F)	15 mois	4.95	7.2	31.9	0.8	9.4

**Légende du tableau V:**

Les paramètres hématologiques ont été dénombrés à partir du sang périphérique de souris transgéniques exprimant différents niveaux de BP1, soit les 43 et 83 qui expriment les plus fortement et 59 qui exprime moins fortement BP1. Légende : RBC, nombre de globules rouges; HGB, la quantité d'hémoglobine; HCT, l'hématocrite ; % Micro, % de globules microcytiques et % Rétic, % de réticulocytes. Nb : nombre de souris analysées.

**Tableau VI.** Paramètres hématologiques de la lignée  $\beta$ BP1 $\beta$ -43

<b>Lignée</b>	<b>Nb</b>	<b>Âge</b>	<b>PLT</b>	<b>PDW</b>
<b>Ctr</b>	6	8-10 mois	1301 $\pm$ 157	53.8 $\pm$ 4.3
<b>43</b>	5	9-11 mois	442 $\pm$ 325 <b>p&lt;0.001</b>	63.4 $\pm$ 6.4 <b>p&lt;0.02</b>

**Légende du tableau VI :**

Les paramètres hématologiques ont été dénombrés à partir du sang périphérique de souris transgéniques exprimant le plus fortement BP1, soit la lignée 43. Légende : PLT, plaquettes; PDW, la distribution morphologique des plaquettes. Nb : nombre de souris analysées.

# Chapitre 4

## DISCUSSION ET CONCLUSION

### 4.1 Discussion

#### 4.1.1 Rôle de l'expression de BP1 au stade adulte dans l'érythropoïèse

Afin de déterminer le rôle de BP1 humain dans l'érythropoïèse, l'expression de son ADNc a été ciblée aux cellules érythroïdes à tous les stades du développement. Les études *in vitro* ont démontré que BP1 humain est un répresseur du gène de  $\beta$ -globine adulte au stade fœtal (Chase et al., 2002). Nous avons donc voulu exprimer BP1 au stade adulte afin d'étudier son rôle dans l'érythropoïèse.

Pour ce faire, nous avons utilisé les séquences régulatrices du gène de  $\beta$ -globine adulte humain. Tout d'abord, le promoteur utilisé a été tronqué afin d'enlever les deux sites de liaison de BP1 aux positions -550 à -527 pb et -302 à -294 pb. L'utilisation du promoteur tronqué s'avère nécessaire afin d'éviter une auto-inhibition du transgène. Il a été démontré, auparavant, que l'utilisation de ce même promoteur, combiné à la région 3' de  $\beta$ -globine (à partir de *PmLI* à 62610 à *BglII* à 65558) et à un  $\mu$ LCR, amène l'expression de l'ADNc de GATA-1 humain dans les cellules érythroïdes embryonnaires et adultes dans une souris transgénique (Li et al., 1997). Nous avons aussi ajouté la région en 3' de  $\beta$ -globine (à partir de *BamHI* à 62613 à *EcoRV* à 65427) car nous voulions exprimer un ADNc. Plusieurs études ont démontré l'importance des introns pour l'expression d'un



gène dans une souris transgénique, plus particulièrement la fonction de l'intron 2 du gène de  $\beta$ -globine (Collis et al., 1990). Afin d'obtenir de forts niveaux d'expression de notre transgène, nous avons ajouté à notre construction le LCR de 8 Kb (Forrester et al., 1989).

L'obtention d'une seule souris transgénique fondatrice LCR $\beta$ BP1 $\beta$ -32 pour la construction complète LCR $\beta$ BP1 $\beta$  et d'une seconde souris fondatrice LCR $\beta$ BP1 $\beta$ -118 mais avec la construction délétée du LCR soulève quelques hypothèses. De plus, l'absence de progéniture transgénique pour la fondatrice LCR $\beta$ BP1 $\beta$ -32 et son sexe féminin ont rendu les analyses plus difficiles et limitées. Premièrement, on pourrait penser que la préparation du fragment à microinjecter est toxique pour les œufs, mais après vérification, on voit que les œufs sont viables et doublent correctement après avoir été microinjectés. Deuxièmement, ces résultats suggèrent que la présence de BP1 au stade embryonnaire est létale chez la souris. Le fait que le transgène n'a pas été transmis dans une progéniture issue d'un croisement de la fondatrice LCR $\beta$ BP1 $\beta$ -32 avec un mâle F1 (C57Bl/6 X CBA/J), renforce l'hypothèse de létalité *in utero* et nous indique que la fondatrice est peut-être aussi très mosaïque. L'intégration du transgène aurait eu lieu à un stade de division plus avancé que le stade de une cellule. Nous avons pensé restaurer le phénotype de létalité *in utero* en croisant la fondatrice avec un mâle transgénique YAC- $\beta$ -globine, mais aucune progéniture transgénique n'a été obtenue avec ce croisement.

Afin de renforcer l'hypothèse de létalité *in utero*, l'expression de BP1 a été vérifiée dans le sang périphérique de la fondatrice LCR $\beta$ BP1 $\beta$ -32 par protection à

la RNase et par RT-PCR. Comparativement à une souris négative, BP1 est exprimé dans le sang périphérique de la fondatrice. Aucune analyse n'a été faite avec la fondatrice ayant un transgène tronqué, soit LCR $\beta$ BP1 $\beta$ -118, car elle n'exprimait pas BP1 ou bien que son expression était sous le seuil de notre détection.

Le décès un peu précoce de la fondatrice LCR $\beta$ BP1 $\beta$ -32, à l'âge de 18 mois, suggère que celle-ci était en mauvaise santé. De plus, sa cellularité près de deux fois plus élevée que les contrôles suggèrent une anomalie au niveau de l'hématopoïèse. Kean et al., 2002, ont montré qu'un modèle de souris thalassémique présentait aussi une cellularité au niveau de la moelle osseuse deux fois plus élevée que des souris contrôles. Comme BP1 réprime le gène humain adulte de  $\beta$ -globine *in vitro*, on peut penser que chez la souris, une répression des gènes murins par BP1 pourrait causer une thalassémie chez cette fondatrice. L'analyse pathologique nous a démontré qu'elle présentait une splénomégalie, une désorganisation des pulpes rouge et blanche de la rate et des foyers d'érythropoïèse suggérant aussi un défaut érythropoïétique. Une accumulation de protéines de sérum amyloïde A (SAA) est observable, par microscopie électronique (résultats non montrés), dans la rate et plusieurs autres organes. Comme ces protéines ont un rôle dans les processus d'inflammation et d'infection et que l'on ne leur connaît pas de rôle dans les défauts hématopoïétiques, il est difficile d'associer cette observation à la présence de BP1. Par contre, on ne peut pas exclure cette possibilité, il est facilement envisageable qu'une induction

érythropoïétique trop prolongée, causée par la présence de BP1, puisse être responsable de la sécrétion de ces protéines SAA.

Les observations pathologiques de la fondatrice LCR $\beta$ BP1 $\beta$ -32, nous porte à croire que BP1 humain pourrait jouer un rôle dans l'érythropoïèse murine. Cependant, les phénotypes observés peuvent être aussi dus à la position d'intégration du transgène qui aurait affecter l'expression d'un autre gène impliqué dans l'érythropoïèse murine. Comme nous n'avions qu'une seule fondatrice ne générant aucune souris transgénique, aucune analyse pour vérifier cette hypothèse n'a été effectuée.

Les résultats obtenus nous ont surpris, nous avons préalablement vérifié que les séquences consensus de BP1 étaient absentes des régions promotrices des gènes murins adultes de globine. Mais, comme BP1 lie aussi des régions riches en AT, et qu'il en existe plus en amont des régions promotrices de ces gènes (par exemple, un motif (AT)<sub>4</sub>AT<sub>2</sub> à -545pb du site d'initiation du promoteur de  $\beta^{\text{maj}}$  (Berg, et al., 1989)), il est possible que BP1 lorsqu'exprimé fortement puisse lier ces séquences et affecter l'expression de ces gènes.

#### 4.1.2 Implication du rôle de BP1 humain dans l'érythropoïèse murine *in vitro*

Suite à ces résultats inattendus, nous avons pensé que l'expression forte de BP1 cause une létalité *in utero* et que la fondatrice LCR $\beta$ BP1 $\beta$ -32 était très chimérique, ce qui lui a permis de se développer jusqu'au stade adulte. Afin d'appuyer ces hypothèses, il faut montrer que BP1 humain joue un rôle dans l'érythropoïèse murine, potentiellement en réprimant les gènes adultes de  $\beta$ -

globine endogène, soit  $\beta^{\min}$  et/ou  $\beta^{\text{maj}}$  et/ou  $\beta^{\text{single}}$  (un second haplotype de globine). Pour répondre à notre hypothèse, nous avons utilisé le système de différenciation des cellules souches embryonnaires murines qui sont un bon modèle d'étude de la maturation des précurseurs hématopoïétiques (Keller et al., 1993).

Pour ce faire, nous avons généré des transfectants stables à l'aide de la construction précédente et d'une construction contrôle, c'est-à-dire LCR $\beta$ BP1 $\beta$  et LCR $\beta\beta$ , délété de l'ADNc de BP1. Cette construction contrôle a été utilisée afin de corroborer les résultats obtenus à la présence de BP1 et non à un effet de l'électroporation des cellules ES. Nous avons généré des transfectants stables afin d'étudier le rôle de BP1 humain dans la différenciation des cellules ES en précurseurs hématopoïétiques et, plus particulièrement, en précurseurs érythropoïétiques primitifs et définitifs selon la méthode décrite par Gordon Keller (Keller et al, 1993).

Nous avons utilisé l'électroporation comme moyen de transfection car c'est le processus le plus utilisé et le plus efficace pour les cellules ES (Pevny et al., 1991). Comme nos constructions plasmidiques ont été réalisées à partir du vecteur pBluescript et que celui-ci ne contient aucun marqueur de sélection pour les cellules eucaryotes, nous avons effectuées une cotransfection avec un vecteur pSV3néo. Ce vecteur contient le gène de sélection néomycine qui apporte la résistance au G-418. Après les cotransfections, nous avons obtenus 51 clones stables, dont 14 clones pour le transgène LCR $\beta$ BP1 $\beta$  et 37 pour LCR $\beta\beta$ . Comme nous avons transfecté les vecteurs circulaires, une analyse génomique adéquate a

été effectuée afin de s'assurer de l'intégrité des transgènes. Le criblage génomique a été réalisé par transfert Southern et nous avons déterminé qu'au moins trois transfectants sont intègres pour LCR $\beta$ BP1 $\beta$  (soient les clones #5, 9 et 14) et quatre transfectants sont intègres pour LCR $\beta\beta$  (soient les clones #I-2, I-9, II-2 et II-12). Les autres clones ne sont pas intègres pour le transgène en entier, puisque les bandes attendues sont soit plus courtes, soit ont perdu les sites des enzymes de restriction utilisées pour le diagnostic et ont des bandes plus longues que celles attendues. Mais, ces bandes plus longues laissent supposer qu'il y a perte d'une partie du transgène voulu et présence de séquences du vecteur. La faible proportion de clones intègres peut s'expliquer par l'utilisation des vecteurs circulaires lors de l'électroporation. Les coupures nécessaires à l'intégration du transgène dans le génome des cellules ES peuvent survenir à n'importe quel endroit du vecteur. Comme nous n'avons utilisé qu'une sélection positive (résistance au G-418), le site d'intégration chromosomique peut être différent pour chaque clone. Ceci peut être observable par les différents patrons obtenus suite au transfert Southern, résultant des jonctions différentes pour chacun des clones.

Afin de déterminer si BP1 a un rôle dans la différenciation érythrocytaire murine, les transfectants stables de même que les cellules ES non transfectées ont été différenciées en corps embryonnaires et en colonies hématopoïétiques. Nous avons analysé l'expression de BP1 durant cette différenciation, le pourcentage d'hémoglobinisation des corps embryonnaires et le nombre de précurseurs générés pour chacun des transfectants. Nous avons montré que BP1 n'est pas exprimé au

cours de la différenciation en corps embryonnaires et en précurseurs érythroïdes des cellules ES non transfectées et des clones stables LCR $\beta$  $\beta$ . Par contre, l'expression de BP1 dans les clones LCR $\beta$ BP1 $\beta$  est détectable au sixième jour de la différenciation des corps embryonnaires et est non-détectable à partir du dix-huitième jour. De plus, BP1 est exprimé dans les précurseurs érythroïdes primitifs et définitifs. Nous avons analysé l'expression du gène endogène  $\beta^{\text{maj}}$  afin de vérifier notre système de différenciation. L'expression de  $\beta^{\text{maj}}$  est détectable au sixième jour de différenciation et augmente jusqu'au quinzième jour pour disparaître à partir du dix-huitième jour. Keller et al., 1993, ont rapporté l'expression de plusieurs gènes durant la différenciation des cellules ES, dont celle de  $\beta^{\text{maj}}$  et leur profil d'expression correspond bien à celui que nous avons observé. Nous avons aussi remarqué que si on compare les niveaux d'expression de BP1 par rapport à S16 (le contrôle interne de la réaction de RT-PCR semi-quantitative), il y a une augmentation d'un facteur deux à trois de l'expression de BP1 dans les précurseurs érythroïdes par rapport aux corps embryonnaires du neuvième jour. Donc, l'expression de BP1 augmente durant la différenciation des corps embryonnaires mais aussi dans les précurseurs érythroïdes primitifs et définitifs.

Cependant, avec les différents essais de PCR utilisés, nous avons remarqué la présence d'un transcrit supplémentaire. Ce transcrit a été séquencé afin de déterminer sa nature. Ce transcrit provient d'un épissage aberrant entre l'exon 3 de  $\beta$ -globine et le 160<sup>e</sup> acides aminés de l'ADNc de BP1. L'ARNm obtenu est donc tronqué de 80 acides aminés (240 nucléotides), des 170 pb non-codantes de BP1 incluses dans la construction et des 18 pb de l'exon 2 de  $\beta$ -globine. Ce

transcrit est observé en même temps que le transcrit complet du transgène. La proportion de ce transcrit par rapport au transcrit complet n'a pas été mesurée de manière quantitative. Afin de déterminer approximativement les niveaux d'expression du transcrit complet de BP1 par rapport à S16, nous avons effectué un essai à l'aide d'un oligo dans la partie de BP1 qui est spécifique au transcrit complet. Comme les trois clones stables LCR $\beta$ BP1 $\beta$  expriment les deux transcrits, et que nous ne possédons aucun anticorps contre la protéine BP1, il est difficile d'associer les phénotypes observés à la présence de BP1 entier ou bien à la présence de la protéine tronquée.

Tout de même, nous avons observé certains résultats qui sont potentiellement intéressants. Au niveau des corps embryonnaires, même si BP1 est exprimé, on n'observe aucune différence significative dans le pourcentage d'hémoglobinisés. Comme ces EBs représentent une population hétérogène de précurseurs, il est possible que l'effet de BP1 sur les précurseurs érythroïdes soit dilué, ou bien qu'il y ait compensation d'un des gènes de globine pour un autre qui serait réprimé par BP1. C'est pourquoi, nous avons poursuivi la différenciation de ces EBs en précurseurs érythroïdes. Nous avons déjà mentionné que BP1 est exprimé dans ces précurseurs érythroïdes primitifs et définitifs, mais BP1 semble n'avoir aucun effet sur le nombre de précurseurs primitifs comparativement à ceux générés à partir des cellules ES sauvages ou de celles transfectées avec la construction contrôle. Par contre, au niveau des précurseurs érythroïdes définitifs, la présence de BP1 entraîne une diminution significative de leur nombre par rapport à ceux des cellules ES sauvages ou transfectées avec la construction

contrôle. Pour ce qui est des autres précurseurs hématopoïétiques définitifs, leur nombre reste inchangé en présence de BP1. Ces observations suggèrent que BP1 joue un rôle dans la différenciation des précurseurs érythroïdes définitifs et soutient l'hypothèse qu'*in vivo*, son expression chez la souris transgénique peut entraîner une létalité *in utero*.

Comme l'expression forcée de BP1 au stade adulte ne représente pas le profil d'expression normal d'une souris, les résultats observés au niveau de la différenciation des précurseurs adultes viennent affecter le développement murin normal et la différenciation *in vitro*. Les résultats obtenus, c'est-à-dire un blocage de la différenciation érythroïde définitive, soutiennent l'hypothèse de répression par BP1 des gènes de  $\beta$ -globine adultes au stade fœtal. Cependant, l'interprétation des résultats doit tenir compte que cette expression est anormale et peut changer le développement murin d'une autre manière.

Comme nous avons identifié un deuxième transcrit, nous sommes retournés vérifier sa présence dans le sang périphérique de la souris fondatrice LCR $\beta$ BP1 $\beta$ -32 et effectivement, ce deuxième transcrit aberrant y était aussi présent. Afin de vraiment associer un rôle de BP1 humain dans l'érythropoïèse murine, il faudrait évaluer si ce transcrit produit une protéine tronquée et si celle-ci pourrait jouer certains rôles, comme par exemple agir comme dominant négatif de BP1. Dans ce cas, la formulation des hypothèses du rôle de BP1 serait à revoir. Mais comme les deux expériences vont dans le même sens et sont explicables par une fonction répresseuse de BP1, il est fort probable que ce deuxième transcrit ne soit pas stable et n'exerce donc aucun rôle dans nos études.



#### 4.1.3 Implication du rôle de BP1 humain dans l'érythropoïèse murine *in vivo*

En parallèle de l'étude avec les cellules ES, nous avons aussi généré des souris transgéniques qui exprimeraient BP1 dans la lignée érythroïde au stade adulte dans le but d'évaluer son rôle *in vivo* dans l'érythropoïèse murine. Nous voulions cependant diminuer les niveaux d'expression de BP1 afin que ces souris transgéniques puissent se rendre au stade adulte.

Pour ce faire, nous avons utilisé la construction initiale, LCR $\beta$ BP1 $\beta$ , que nous avons délété du LCR et que nous avons nommé  $\beta$ BP1 $\beta$ . La perte du LCR devait diminuer les niveaux d'expression et rendre celle-ci dépendante du site d'intégration et indépendante du nombre de copies. Tous les autres éléments ont été gardés pour les mêmes raisons que mentionnées plus haut.

Après microinjection du fragment purifié, nous avons obtenu 12 souris transgéniques fondatrices sur 93 souriceaux analysés par transfert Southern. Les 12 fondatrices portaient le transgène intègre et leur nombre de copies variaient de 1 à plus de 35. L'obtention d'un aussi grand nombre de souris renforce l'hypothèse de létalité *in utero* pour la première construction portant le LCR.

Les souris fondatrices ont été croisées afin de générer les lignées de souris transgéniques. Neuf fondatrices ont transmis le transgène à leur progéniture dans une proportion de 19 à 65 % de transmission, reflétant pour chacune leur niveau mosaïque. Parmi les trois fondatrices n'ayant pas transmis le transgène,  $\beta$ BP1 $\beta$ -53 est décédée à l'âge de dix semaines sans avoir généré de progéniture alors que  $\beta$ BP1 $\beta$ -18 et  $\beta$ BP1 $\beta$ -90 ont généré, respectivement 60 et 45 souriceaux et aucun

ne s'est avéré positif. Comme la fondatrice  $\beta\text{BP1}\beta\text{-18}$  exprimait BP1 dans son sang périphérique, il est possible d'envisager la même hypothèse que pour la fondatrice  $\text{LCR}\beta\text{BP1}\beta\text{-32}$ , c'est-à-dire qu'elle soit très mosaïque et que la transmission du transgène soit létale pour sa progéniture.

L'expression du transgène BP1 chez les souris transgéniques a été mesuré par protection à la RNase et RT-PCR. Pour la protection à la RNase, nous avons utilisé une sonde différente de celle générée pour l'analyse de  $\text{LCR}\beta\text{BP1}\beta\text{-32}$  car nous pensions avoir des problèmes d'hybridation. Nous avons donc utilisé une sonde en 3' du transgène, soit une sonde couvrant l'intron 2 et l'exon 3 de  $\beta$ -globine. Comme nous avons utilisé un contrôle positif, soit l'ARN du sang périphérique des souris YAC- $\beta$ -globine, l'essai a été mis au point. Par contre, les niveaux d'expression des lignées transgéniques se sont avérés très faibles (tel qu'attendu) et l'hybridation de la sonde, contrairement à une sonde contrôle ( $\alpha$ -globine murine), ne nous a pas permis de quantifier convenablement l'expression de chacune des lignées. Nous aurions dû utiliser une sonde contrôle dont l'expression est beaucoup plus faible afin de produire des résultats comparatifs. Seulement la lignée  $\beta\text{BP1}\beta\text{-43}$ , qui s'avère être celle avec le plus fort niveau d'expression, nous laisse voir un fragment protégé par la sonde (résultats non montrés). Par RT-PCR, nous avons évalué les lignées exprimant BP1 au niveau du sang périphérique mais aussi au niveau de la moelle osseuse. Les niveaux d'expression sont très variables et plutôt faibles, mais cela correspond à ce que l'on attendait étant donné que le LCR est absent de notre construction. Le transgène est donc dépendant de son site d'intégration et indépendant du nombre

de copies intégrées. On peut quand même associer le nombre de copies élevées pour les lignées  $\beta\text{BP1}\beta\text{-43}$  et  $\beta\text{BP1}\beta\text{-80}$  au plus fort niveau d'expression de BP1 dans le sang périphérique. Tout en n'étant pas quantitative, il semble que l'expression de  $\beta\text{BP1}\beta\text{-43}$  dans la moelle osseuse est plus élevée que celle de  $\beta\text{BP1}\beta\text{-80}$ . L'expression de BP1 de  $\beta\text{BP1}\beta\text{-80}$  dans le sang périphérique semble diminuer par rapport à la moelle osseuse. Afin de corroborer les analyses phénotypiques, il faudrait évaluer l'expression de BP1 de manière plus quantitative, soit par RT-PCR quantitatif, et tant au niveau du sang périphérique qu'au niveau de la moelle osseuse. Ceci permettrait d'observer s'il y a une certaine sélection au niveau de la moelle osseuse pour les cellules qui n'exprimerait pas BP1, ce qui diminuerait donc son expression dans le sang périphérique. De plus, nous avons observé dans toutes les lignées exprimant BP1 la présence du transcrit aberrant. Encore une fois, la quantification de ce transcrit par rapport au transcrit complet n'a pas été faite.

L'analyse des paramètres hématologiques a été effectuée pour les lignées ayant différents niveaux d'expression de BP1. Parmi les trois lignées présentées, les niveaux d'expression semble être plus élevés pour  $\beta\text{BP1}\beta\text{-43}$ , ensuite  $\beta\text{BP1}\beta\text{-83}$  et  $\beta\text{BP1}\beta\text{-59}$ . On peut observer une tendance significative à la baisse pour le nombre de globules rouges, la quantité d'hémoglobine, l'hématocrite et une augmentation du pourcentage de cellules microcytiques pour ces trois lignées en comparaison avec des contrôles négatifs de même âge. Cette tendance est plus prononcée pour les lignées  $\beta\text{BP1}\beta\text{-43}$  et  $\beta\text{BP1}\beta\text{-83}$ . Ceci suggère un défaut hématopoïétique, plus particulièrement au niveau érythrocytaire. Ces résultats

tendent encore à valider un rôle de BP1 dans l'érythropoïèse murine définitive. Pour ce qui est de la fondatrice  $\beta$ BP1 $\beta$ -18 qui n'a pas transmis le transgène, ce défaut est encore plus significatif malgré qu'il n'y ait qu'une seule souris analysée. Pour la lignée  $\beta$ BP1 $\beta$ -43, qui semble posséder le plus haut niveau d'expression, on observe aussi une diminution significative du nombre de plaquettes et une augmentation de leur distribution par rapport aux souris contrôles. Comme ce défaut est observable pour une seule lignée, il est difficile de l'associer à la présence de BP1. Ce défaut peut être dû au site d'intégration du transgène dans cette lignée. Mais, comme cette lignée semble avoir la plus forte expression de BP1, il est possible de penser que son niveau d'expression peut aussi être responsable de ce défaut du nombre de plaquettes. Dans la littérature, on attribue deux rôles à la protéine GATA-1, un rôle érythrocytaire (en absence de GATA-1, on observe un arrêt de la maturation des proérythroblastes et une augmentation de l'apoptose) et mégacaryocytaire ( en absence de Gata-1, on observe un arrêt du développement des mégacaryocytes avec une hyperprolifération de ces précurseurs). On sait qu'un des partenaires protéiques de GATA-1 est FOG-1, et que l'absence de FOG-1 cause un défaut des plaquettes beaucoup plus prononcé, ce qui suggère que FOG-1 aurait un rôle dépendant et un indépendant de GATA-1 dans la différenciation des mégacaryocytes. On peut penser que BP1 a aussi un rôle au niveau des globules rouges et des plaquettes. Mais comme aucun partenaires de BP1 ne sont connus et que le phénotype plaquettaire n'a été observé que chez une seule lignée, il est difficile d'associer un mécanisme de régulation à

BP1. L'analyse plus en profondeur des autres lignées et des temps de saignement des souris devraient confirmer ou non cette hypothèse.

## 4.2 Conclusion

L'ensemble de ces résultats tend à démontrer que BP1 humain joue un rôle *in vitro* et *in vivo* dans l'érythropoïèse murine et potentiellement dans l'érythropoïèse humaine. Nous envisageons d'évaluer le rôle de BP1 dans l'érythropoïèse humaine en croisant nos souris transgéniques BP1 avec des souris YAC- $\beta$ -globine qui contiennent le locus entier de  $\beta$ -globine humain. Mais, auparavant, afin d'affirmer que BP1 joue réellement un rôle dans l'érythropoïèse murine, plusieurs analyses doivent être faites. Premièrement, pour la construction LCR $\beta$ BP1 $\beta$ , il serait intéressant d'analyser à quel jour embryonnaire survient la létalité *in utero*. Grâce aux analyses *in vitro* des cellules ES, on peut penser que cette létalité surviendra vers les jours 11 ou 12, au moment où l'érythropoïèse primitive du sac vitellin subit une commutation à l'érythropoïèse définitive dans le foie fœtal. Bien entendu, il faudra s'assurer que le transcrit aberrant n'est pas traduit et donc qu'il ne cause aucun phénotype observable.

Avec les études *in vitro* et les souris transgéniques  $\beta$ BP1 $\beta$ , il faudra semi-quantifier l'expression de BP1 et des gènes de globine murins (des essais ont été fait avec  $\beta^{\text{maj}}$  (non montrés), mais son expression est tellement forte en comparaison avec BP1 que nous n'avons pu voir un effet répresseur quelconque). Des essais quantitatifs en RT-PCR seront sûrement intéressants afin de visualiser

l'action de BP1 sur plusieurs autres gènes érythrocytaires, tels que l'érythropoïétine ou GATA-1 et sur les gènes murins de globine.

Comme l'absence de GATA-1 semble jouer un rôle dans l'apoptose des précurseurs érythroïdes définitifs (Weiss et al., 1995), il serait intéressant de voir si nos précurseurs érythroïdes définitifs exprimant BP1 sont diminués dus à un arrêt de différenciation causée par une augmentation de l'apoptose. Des essais tunnels sur nos clones stables en différenciation pourrait nous indiquer la présence ou non d'apoptose.

Le but initial d'analyser le rôle de BP1 sur le gène humain de  $\beta$ -globine adulte (par des croisements des souris transgéniques BP1 avec les souris YAC- $\beta$ -globine) s'est avéré en réalité plus complexe que prévu. Par contre, cette étude nous aura permis d'associer la régulation du locus de  $\beta$ -globine murin plus près de celle du locus humain. Il y a une différence tant qu'aux commutations embryonnaire à fœtal et fœtal à adulte qui sont semblables ou non chez la souris (une ou deux commutations). Avec ces études, la compréhension des mécanismes de régulation du locus de  $\beta$ -globine murin nous permettra d'élaborer de nouvelles approches afin d'étudier la régulation du locus humain par BP1. Plusieurs facteurs de transcriptions sont communs chez l'homme et la souris et BP1 humain possède peut-être un homologue murin qui aurait une fonction dans la régulation des gènes de globine ou des autres gènes érythrocytaires.

De plus, la détermination du rôle répresseur de BP1 sur le gène adulte de  $\beta$ -globine humain pourrait permettre d'envisager le traitement de certaines hémoglobinopathies de manière différente.

## Bibliographie

Arceci,R.J., King,A.A.J., Simon,M.C., Orkin,S.H., and Wilson,D.B. (1993). Mouse GATA-4 : a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 2235-2246.

Asano,H., and Stamatoyannopoulos,G. (1998). Activation of beta-globin promoter by erythroid Kruppel-like factor. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 102-109.

Asano,H., Li,X.S., and Stamatoyannopoulos,G. (1999). FKLf, a novel Kruppel-like factor that activates human embryonic and fetal beta-like globin genes. *Mol. Cell Biol.* *19*, 3571-3579.

Axelrad,A.A., McLeod,D.L., Shreeve,M.M., and Heath,D.A. (1974). Properties of cells that produce erythrocytic colonies *in vitro*. Hemopoiesis in culture, ed. Robinson, 226-234.

Behringer,R.R., Ryan,T.M., Palmiter,R.D., Brinster, R.L., and Townes,T.M. (1990). Human  $\gamma$ - et  $\beta$ -globin gene switching in transgenic mice. *Genes Dev.* *4*, 380-389.

Bei,M., and Maas,R. (1998). FGFs and BMP4 induce both Msx-1-independent and Msx-1-dependent signaling pathways in early tooth development. *Development* *125*, 4325-4333.

Bender,M.A., Bulger,M., Close,J., and Groudine,M. (2000). Beta-globin gene switching and DNase I sensitivity of the endogenous beta-globin locus in mice do not require the locus control region. *Mol. Cell* *5*, 387-393.

Benson,M.D., Bargeon,J.L., Xiao,G., Thomas,P.E., Kim,A., Cui,Y., and Franceschi,R.T. (2000). Identification of a homeodomain binding element in the bone sialoprotein gene promoter that is required for its osteoblast-selective expression. *J. Biol. Chem.* *275*, 13907-13917.

Berg,P.E., Mittelman,M., Elion,J., Labie,D., and Schechter,A.N. (1991). Increased protein binding to a -530 mutation of the human beta-globin gene associated with decreased beta-globin synthesis. *Am. J. Hematol.* *36*, 42-47.

Berg,P.E., Williams,D.M., Qian,R.L., Cohen,R.B., Cao,S.X., Mittelman,M., and Schechter,A.N. (1989). A common protein binds to two silencers 5' to the human beta-globin gene. *Nucleic Acids Res.* *17*, 8833-8852.

Bodine,D.M., and tey,T.J. (1987). An enhancer element lies 3' to the human  $\gamma$  globin gene. *EMBO J.* 6, 2997-3004.

Bradley,T.R., and Metcalf,D. (1966). The growth of mouse bone marrow cells *in vitro*. *Aust. J. exp. Biol. Med. Sci.* 44, 287-300.

Brecher,G., Bookstein,N., Redfearn,W., Necas,E., Pallavicini,M.G., and Cronkite,E.P. (1993). Self-renewal of the long-term repopulating stem cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 6028-6031.

Bulfone,A., Kim,H.-J., Puelles,L., Porteus,M.H., Grippo,J.E., and Rubenstein, J.L.R. (1993). The mouse *Dlx-2* (*Tes-1*) gene is expressed in spatially restricted domains of the forebrain, face and limbs in midgestation mouse embryos. *Mech. Dev.* 40, 129-140.

Bulger,M., von Doorninck,J.H., Saitoh,N., Telling,A., Farrell,C., Bender,M.A., Felsenfeld,G., Axel,R. and Groudine,M. (1999). Conservation of sequence and structure flanking the mouse and human beta-globin loci : The beta-globin genes are embedded within an array of odorant receptor genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 5129-5134.

Cantor,A.B. and Orkin,S.H. (2002). Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. *Oncogene* 21, 3368-3376.

Cao,S.H., Gutman,P.D., Dave,H.P.G., and Schlechter,A.N. (1989). Identification of a transcriptional silencer in the 5'flanking region of the human  $\epsilon$ -globin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86, 5306-5309.

Case,S.S., Huber,P., and Lloyd,J.A. (1999). The gammaPE complex contains both SATB1 and HOXB2 and has positive and negative roles in human gamma-globin gene regulation. *DNA Cell Biol.* 18, 805-817.

Chada,K., Magram,J., Raphael,K., Radice,G., Lacy,E., and Constantini,F. (1985). Specific expression of a foreign  $\beta$ -globin gene in erythroid cells of transgenic mice. *Nature* 314, 377-380.

Chang,C.P., Shen,W.F., Rozenfeld,S., Lawrence,H.J., Largman,C., and Cleavy,M.L. (1995). Pbx proteins display hexapeptide-dependent cooperative DNA binding with a subset of Hox proteins. *Genes Dev.* 9, 663-674.

Chase,M.B., Fu,S., Haga,S.B., Davenport,G., Stevenson,H., Do,K., Morgan,D., Mah,A.L., and Berg,P.E. (2002). BP1, a homeodomain-containing isoform of DLX4, represses the beta-globin gene. *Mol. Cell Biol.* 22, 2505-2514.

Choi,K., Kenedy,M., Kazarov,A., Papadimitriou,J.C., and Keller,G. (1998). A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* 125, 725-732.



Collis,P., Antoniou,M., and Grosveld,F. (1990). Definition of the minimal requirements within the human  $\beta$ -globin gene and the dominant control region for high level expression. *EMBO J.* 9, 233-240.

Crispino,J.D., Lodish,M.B., MacKay,J.P., and Orkin,S.H. (1999). Use of altered mutants to probe a specific protein-protein interaction in differentiation : the GATA-1 : FOG complex. *Mol. Cell.* 3, 219-228.

Crotta,S., Nicolis,S., Ronchi,A., Ottolenghi,S., Ruzzi,L., Shimada,Y., Migliaccio,A.R., and Migliaccio,G. (1990). Progressive inactivation of the expression of an erythroid transcriptional factor in GM- and G-CSF-dependent myeloid cell lines. *Nucleic Acids Res.* 18, 6863-6869.

Cumano,A., Furlonger,C., and Paige,C.J. (1993). Differentiation and characterization of B-cells precursors detected in the yolk sac and embryo body of embryos beginning at the 10- to 12-somite stage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 6429-6433.

Dieterlen-Lièvre,F., and Martin,C. (1981). Diffuse intraembryonic hemopoiesis in normal and chimeric avian development. *Dev. Biol.* 88, 180-191.

Dillon,N., and Grosveld,F. (1991). Human  $\gamma$ -globin genes silenced independently of other genes in the  $\beta$ -globin locus. *Nature* 350, 252-254.

Doetschman,T.C., Eistetter,H., Katz,M., Schmidt,W., and Kemler,R. (1985). The *in vitro* development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines : Formation of visceral yolk sac, blood islands, and myocardium. *J. Embryol. Exp. Morph.* 87, 27-45.

Dolle, P., Price,M., and Duboule, D. (1992). Expression of the murine *Dlx-1* homeobox during facial, ocular and limb development. *Differentiation* 49, 93-99.

Donze,D., Townes,T.M., and Bieker,J.J. (1995). Role of erythroid kruppel-like factor in human  $\gamma$ - to  $\beta$ -globin gene switching. *J. Biol. Chem.* 270, 1955-1959.

Ebb,D., Tang,D.C., Drew,L., Chin,K., Berg,P.E., and Rodgers,G.P. (1998). Identification of upstream regulatory elements that repress expression of adult beta-like globin genes in a primitive erythroid environment. *Blood Cells Mol. Dis.* 24, 356-369.

Eisenstat,D.D., Liu,J.K., Mione,M., Zhong,W., Yu,G., Anderson,S.A., Ghattas,I., Puellas,L., and Rubenstein,J.L.R. (1999). *DLX-1*, *DLX-2*, and *DLX-5* expression define distinct stages of basal forebrain differentiation. *J. Comp. Neurol.* 414, 217-237.

Elion,J., Berg,P.E., Lapoumeroulie,C., Trabuchet,G., Mittelman,M., Krishnamoorthy,R., Schechter,A.N., and Labie,D. (1992). DNA sequence variation in a negative control region 5' to the beta-globin gene correlates with the phenotypic expression of the beta s mutation. *Blood* 79, 787-792.

Ellis,D.L., Stock,D.W., Hatch,G., Giroux,G., Weiss,K.M., and Ekker,M. (1997). Relationship between the genomic organization and the overlapping embryonic expression patterns of the zebrafish *Dlx* genes. *Genomics* 45, 580-590.

Epner,E., Reik,A., Cimbor,D., Telling,A., Bender,M.A., Fiering,S., Enver,T., Martin,D.I., Kennedy,M., Keller,G., and Groudine,M. (1998). The beta-globin LCR is not necessary for an open chromatin structure or developmentally regulated transcription of the native mouse beta-globin locus. *Mol. Cell* 2, 447-455.

Enver,T., Raich,N., Ebens,A.J., Papayannopoulou,T., Constantini,F., and Stamatoyannopoulos,G. (1990). Developmental regulation of human fetal-to-adult globin gene switching in transgenic mice. *Nature* 344, 309-313.

Evans,M.J., and Kaufman,M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.

Evans,T., Reitman,M., and Felsenfeld,G.(1988). An erythrocyte-specific DNA binding factor recognizes a regulatory sequence common to all chicken globin genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85, 5976-5980.

Evans,T., and Felsenfeld,G. (1989). The erythrocyte-specific transcription factor eryfl : A new finger protein. *Cell* 5, 877-885.

Fantoni,A., Bank,A., and Marks,P.A. (1967). Globin composition and synthesis of hemoglobins in developing fetal mice erythroid cells. *Science* 157, 1327-1329.

Farrell,C.M., Grinberg,A., Huang,S.P., Chen,D., Pichel,J.G., Westphal,H., and Felsenfeld,G. (2000). A large upstream region is not necessary for gene expression or hypersensitive site formation at the mouse beta -globin locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 14554-14559.

Feledy,J.A., Beanan,M.J., Sandoval,J.J., Goodrich,J.S., Lim,J.H., Matsuo-Takasaki,M., Sato,S.M., and Sargent,T.S. (1999). Inhibitory patterning of the anterior neural plate in *Xenopus* by homeodomain factors *Dlx3* and *Msx1*. *Dev. Biol.* 212, 455-464.

Feledy,J.A., Morasso,M.I., Jang,S.-I., and Sargent,T.S. (1999). Transcriptional activation by the homeodomain protein Distal-less 3. *Nucleic Acids Res.* 27, 764-770.

Filipe,A., Li,Q., Deveaux,S., Godin,I., Roméo,P.-H., Stamatoyannopoulos,G., and Mignotte,V. (1999). Regulation of embryonic/fetal globin genes by nuclear hormone receptors : a novel perspective on hemoglobin switching. *EMBO J.* 18, 687-697.

Ford,C.E., Hamerton,J.L., Barnes,D.W.H., and Loutit,J.F. (1956). Cytological examination of radiation-chimaeras. *Nature* 177, 452-453.

Forrester,W.C., Thompson,C., Elder,J.T. and Groudine,M. (1986). A developmentally stable chromatin structure in the human  $\beta$ -globin gene cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 83, 1359-1363.

Forrester,W.C., Novak,U., Gelinas,R., and Groudine,M. (1989). Molecular analysis of the human  $\beta$ -globin locus activation region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86, 5439-5443.

Frampton,J., Walker,M., Plumb,M., and Harrison,P.R. (1990). Synergy between the NF-E1 erythroid-specific transcription factor and the CACCC factor in the erythroid-specific promoter of the human porphobilinogen deaminase gene. *Mol. Cell. Biol.* 10, 3838-3842.

Fu,S., Stevenson,H., Strovel,J.W., Haga,S.B., Stamberg,J., Do,K., and Berg,P.E. (2001). Distinct functions of two isoforms of a homeobox gene, BP1 and DLX7, in the regulation of the beta-globin gene. *Gene* 278, 131-139.

Fujiwara,Y., Browne,C.P., Cuniff,K., Goff,S.C., and Orkin,S.H. (1996). Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 12355-12358.

Gaensler,K.M., Burmeister,M., Brownstein,B.H., Taillon-Miller,P., and Myers,R.M. (1991). Physical mapping of yeast artificial chromosomes containing sequences from the human  $\beta$ -globin gene region. *Genomics* 10, 976-984.

Gaensler,K.M., Kitamura,M., and Wai kan,Y. (1993). Germ-line transmission and developmental regulation of a 150-Kb yeast artificial chromosome containing the human  $\beta$ -globin locus transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 11381-11385.

Gaiano,N., Kohtz,J.D., Turnbull,D.H., and Fishell,G. (1999). A method for rapid gain-of-function studies in the mouse embryonic nervous system. *Nat. Neurosci.* 2, 812-819.

Grosveld,F., van Assendelft, G.B., Greaves,D.R., and Kollias,B. (1987). Position-independent, high-level expression of the human  $\beta$ -globin gene in transgenic mice. *Cell* 51, 975-985.

Gumucio,D.L., Heilstedt-Williamson,H., Gray,T.A., Tarlé,S.A., Shelton,D.A., Tagle,D.A., Slightom,J.L., Goodman,M., and Collins,F.S. (1992). Phylogenetic footprinting reveals a nuclear protein which binds to silencer sequences in the human  $\gamma$  and  $\epsilon$  globin genes. *Mol. Cell. Biol.* 12, 4919-4929.

Gumucio,D.L., Shelton,D.A., Bailey,W.J., Slightom,J.L., and Goodman,M. (1993). Phylogenetic footprinting reveals unexpected complexity in trans factor binding upstream from the  $\epsilon$ -globin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 6018-6022.

Guy,L.G., Delvoye,N., and Wall,L. (2000). Expression of a human beta-globin transgene in mice with the CACC motif and upstream sequences deleted from the promoter still depends on erythroid Kruppel-like factor. *J. Biol. Chem.* 275, 3675-3680.

Haga,S.B., Fu,S., Karp,J.E., Ross,D.D., Williams,D.M., Hankins,W.D., Behm,F., Ruscetti,F.W., Chang,M., Smith,B.D., Becton,D., Raimondi,S.C., and Berg,P.E. (2000). BP1, a new homeobox gene, is frequently expressed in acute leukemias. *Leukemia* 14, 1867-1875.

Hardison,R., Slightom,J.L., Gumucio,D.L., Goodman,M., Stojanovic,N., and Miller,W. (1997). Locus control regions of mammalian  $\beta$ -globin gene clusters : Combining phylogenetic analyses and experimental results to gain functional insights. *Gene* 205, 73-94.

Ho,I.-C., Vorhees,P., Marin,N., Oakley,B.K., Tsai,S.-F., Orkin,S.H., and Leiden,J.M. (1991). Human GATA-3 : Lineage-restricted transcription factor that regulates the expression of the T cell receptor  $\alpha$  gene. *EMBO J.* 10, 1187-1192.

Hogge,D.E., Sutherland,H.J., Lansdorp,P.M., Phillips,G.L., and Eaves,C.J. (1993). The elusive peripheral blood hemopoietic stem cell. *Sem. In Hemat.* 30, 82-91.

Huang,H., and Auerbach,R. (1993). Identification and characterization of hematopoietic stem cells from the yolk sac of the early mouse embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 10110-10114.

Iscoe,N.N., Senn,J.S., Till,J.E. and McCulloch,E.A. (1971). Colony formation by normal and leukemic human marrow cells in culture : Effect of conditioned medium from human leukocytes. *Blood* 37, 1-5.

Iscoe,N.N., Sieber,F., and Winterhalter,K.H. (1973). Erythroid colony formation in cultures of mouse and human bone marrow : Analysis of the requirement for erythropoietin by gel filtration and affinity chromatography on agarose-concanavalin A. *J. Cell. Physiol.* 83, 309-320.

Iscoe,N.N., and Sieber,F. (1975). Erythroid progenitors in mouse bone marrow detected by macroscopic colony formation in culture. *Exp. Hemat.* 3, 32-43.

Ito,E., Toki,T., Ishihara,H., Ohtani,H., Gu,L., Yokoyama,M., Engel,J.D. and Yamamoto,M. (1993). Erythroid transcription factor GATA-1 is abundantly transcribed in mouse testis. *Nature* 362, 466-468.

Joulin,V., Bories,D., Eleouet,J.-F., Labastie,M.-C., Chretien,S., Mattei,M.-G., and Roméo,P.-H. (1991). A T-cell specific TCR- $\delta$  DNA binding protein is a member of the human GATA family. *EMBO J.* 10, 1809-1816.

Kean,L.S., Brown,L.E., Nichols,J.W., Mohandas,N., Archer,D.R., and Hsu,L.L. (2002). Comparison of mechanisms of anemia in mice with sickle cell disease and  $\beta$ -thalassemia : Peripheral destruction, ineffective erythropoiesis, and phospholipid scramblase-mediated phosphatidylserine exposure. *Exp. Hemat.* 30, 394-402.

Keller,G., Kennedy,M., Papayannopoulou,T., and Wiles,M. (1993). Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture. *Mol. Cell. Biol.* 13, 473-486.

Kennedy,M., Firpo,M., Choi,K., Wall,C., Robertson,S., Kabrun,N., and Keller,G. (1997). A common precursor for primitive erythropoiesis and definitive haematopoiesis. *Nature* 386, 488-493.

Ko,L., Yamamoto,M., Leonard,M.W., George,K.M., Ting,P., and Engel,J.D. (1991). Murine and human T-lymphocyte GATA-3 factors mediate transcription through a cis-regulatory element within the human T-cell receptor  $\delta$  gene enhancer. *Mol. Cell. Biol.* 11, 2778-2784.

Lacaud,G., Robertson,S., Palis,J., Kennedy,M., and Keller,G. (2001). Regulation of hemangioblast development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 938, 96-107.

Lavelle,D., Ducksworth,J., Eves,E., Gomes,G., Keller,M., Heller,P., and De Simone,J. (1991). A homeodomain protein binds to  $\gamma$ -globin gene regulatory sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 7318-7322.

Laverrière,A.C., MacNeill,C., Mueller,C., Poelmann,R.E., Burch,J.B., and Evans,T. (1994). GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut. *J. Biol. Chem.* 269, 23177-23184.

Lawrence,H.J., and Largman,C. (1992). Homeobox genes in normal hematopoiesis and leukemia. *Blood* 80, 2445-2453.

Leach,K.M., Vieira,K.F., Lee Kang,S.-H., Aslanian,A., Teichmann,M., Roeder,R.G., and Bungert,J. (2003). Characterization of the human  $\beta$ -globin downstream promoter region. *Nucleic Acids Res.* 31, 1292-1301.

Leonard,M., Brice,M., Engel,J.D., and papayannopoulou,T. (1993). Dynamics of GATA transcription factor expression during erythroid differentiation. *Blood* 82, 1071-1079.

Li,Q., Clegg,C., Peterson,K., Shaw,S., raich,N., and Stamatoyannopoulos,G. (1997). Binary transgenic mouse model for studying the trans control of globin gene switching : Evidence that GATA-1 is an *in vivo* repressor of human  $\epsilon$  gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 2444-2448.

Li,J., Noguchi,C.T., Miller,W., Hardison,R., and Schechter,A.N. (1998). Multiple regulatory elements in the 5'-flanking sequence of the human  $\epsilon$ -globin gene. *J. Biol. Chem.* 273, 10202-10209.

Lindsley,D.L., Odell,T.T.Jr, and Tausche,F.G. (1956). Implantation of functional erythropoietin elements following total-body irradiation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 90, 512-515.

Liu,C.-P., and Auerbach,R. (1991). *In vitro* development of murine T cells from prethymic and preliver embryonic yolk sac hematopoietic stem cells. *Development* 113, 1315-1323.

Liu,J.-K., Ghattas,I., Liu,S., Chen,S., and Rubenstein,J.L.R. (1997). *Dlx* genes encode DNA-binding proteins that are expressed in an overlapping and sequential pattern during basal ganglia differentiation. *Dev. Dyn.* 210, 498-512.

Liu,Q., Bungert,J., and Engel,J.D. (1997). Mutation of gene-proximal regulatory elements disrupts human  $\epsilon$ -, $\gamma$ -, and  $\beta$ -globin expression in yeast artificial chromosome transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 169-174.

Liu,Q., Tanimoto,K., Bungert,J., and Engel,J.D. (1998). The  $A\gamma$ -globin 3'element provides no unique function(s) for human  $\beta$ -globin locus gene regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 9944-9949.

Lloyd,J.A., Case,S.S., Ponce,E., and Lingrel,J.B. (1994). Positive transcriptional regulation of the human  $\gamma$ -globin gene. *J. Biol. Chem.* 269, 19385-19393.

Magli,M.C., Barba,P., Celetti,A., DeVita,G., Cillo,C., and Boncinelli,E. (1991). Coordinate regulation of HOX genes in human hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 6348-6352.

Magli,M.C., Largman,C., and Lawrence,H.J. (1997). Effects of HOX homeobox genes in blood cell differentiation. *J. Cell Physiol* 173, 168-177.

Magli,M.C. (1998). The role of homeobox genes in hematopoiesis. *Biotherapy* 10, 279-294.

Magram,J., Chada,K., and Constantini,F. (1985). Developmental regulation of a cloned adult  $\beta$ -globin gene in transgenic mice. *Nature* 315, 338-340.

Marine,J., and Winoto,A. (1991). The human enhancer-binding protein Gata3 binds to several T-cell receptor regulatory elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 7284-7288.

Martin,G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 78, 7634-7638.

Martin,D.I. and Orkin,S.H. (1989). An erythroid-specific DNA binding factor mediates increased gamma-globin expression in hereditary persistence of fetal hemoglobin (HPFH). *Prog. Clin. Biol. Res.* 316A, 217-228.

Martin,D.I. and Orkin,S.H. (1990). Transcriptional activation and DNA binding by the erythroid factor GF-1/NF-E1/Eryf 1. *Genes Dev.* 4, 1886-1898.

Masuda,Y., Sasaki,A., Shibuya,H., Ueno,N., Ikeda,K., and Watanabe,K. (2001). Dlxin-1, a novel protein that binds Dlx5 and regulates its transcriptional function. *J. Biol. Chem.* 276, 5331-5338.

Mathews,C.H.E., Detmer,K., Boncinelli,E., Lawrence,H.J., and Largman,C. (1991). Erythroid-restricted expression of homeobox genes of the human HOX 2 locus. *Blood* 78, 2248-2252.

McGuinness,T., Porteus,M.H., Smiga, S., Bulfone,A., Kingsley,C., Qiu,M., Liu,J.K., Long,J.E., Xu,D., and Rubenstein,J.L. (1996). Sequence, organization, and transcription of the Dlx-1 and Dlx-2 locus. *Genomics* 35, 473-485.

Medvinsky,A.L., Samoylina,N.L., Müller,A.M., and Dzierzak,E.A. (1993). An early pre-liver intra-embryonic source of CFU-S in the developing mouse. *Nature* 364, 64-67.

Medvinsky,A.L., and Dzierzak,E.A. (1996). Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* 86, 897-906.

Mermod,N., O'Neill,E.A., Kelly,T.J., and Tjian,R. (1989). The proline-rich transcriptional activator of CTF/NF-1 is distinct from the replication and DNA binding domain. *Cell* 58, 741-753.

Mignotte,V., Eleouet,F., Raich,N., and Roméo,P.-H. (1989). Cis- and trans-acting elements involved in the regulation of the erythroid promoter of the human porphobilinogen deaminase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86, 6548-6551.

Miller,I.J., and Bieker,J.J. (1993). A novel, erythroid cell-specific transcription factor that binds to the CACC element related to the kruppel family of nuclear proteins. *Mol. Cell. Biol.* 13, 2776-2786.

Mitchinson,N.A. (1956). The colonisation of irradiated tissue by transplanted spleen cells. *Br. J. Exp. Pathol.* 37, 239-247.

Miyama,K., Yamada,G., Yamamoto,T.S., Takagi,C., Miyado,K., Sakai,M., Ueno,N., and Shibuya,H. (1999). A BMP-inducible gene, *dlx5*, regulates osteoblast differentiation and mesoderm induction. *Dev. Biol.* 208,123-133.

Moore,M.A.S. and Metcalf,D. (1970). Ontogeny of the haematopoietic system : yolk sac origin of *in vivo* and *in vitro* colony forming cells in the developing mouse embryo. *Br. J. Haematol.* 18, 279-296.

Müller,A.M., Medvinsky,A.L., Strouboulis,J., Grosveld,F., and Dzierzak,E.A. (1994). Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity* 1, 291-301.

Murray,P.D.F. (1932). The development *in vitro* of the blood of the early chick embryo. *Proc. Roy. Soc. London* 11, 497-521.

Nagai,T., Harigae,H., Ishihara,H., Motohashi,H., Minegishi,N., Tsuchiya,S., Hayashi,N., Gu,L., Andres,B., Engel,J.D. (1994). Transcription factor GATA-2 is expressed in erythroid, early myeloid, and CD34<sup>+</sup> human leukemia-derived cell lines. *Blood* 84, 1074-1084.

Nakamura,S., Stock,D.W., Wydner,K.L., Bollekens,J., Takeshita,K., Nagai,B.M., Chiba,S., Kitamura,T., Freeland,T.M., Zhao,Z., Minowada,J., Lawrence,J.B., Weiss,K.M., and Ruddie,F.H. (1996). Genomic analysis of a new mammalian distal-less gene : Dlx7. *Genomics* 38, 314-324.

Nakano,T., Kodama,H., and Honjo,T. (1996). *In vitro* development of primitive and definitive erythrocytes from different precursors. *Science* 272, 722-724.

Neuteboom,S.T., Peltenburg,L.T., van Dijk,M.A., and Murre,C. (1995). The hexapeptide LFPWMR in Hoxb-8 is required for cooperative DNA binding with Pbx1 and Pbx2 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 9166-9170.

Nichols,K.E., Crispin,J.D., Poncz,M., White,J.G., Orkin,S.H., Maris,J.M., and Weiss,M.J. (2000). Familial dyserythropoietic anaemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in GATA1. *Nature Genet.* 24, 266-270.

Nowell,P.C., Cole,L.J., Habermeyer,J.G., and Roan,P.L. (1956). Growth and continued function of rat marrow cells in X-radiated mice. *Cancer Res.* 16, 258-261.

Nuez,B., Michalovic,D., Bygrave,A., Ploemacher,R., and Grosveld,F. (1995). Defective haematopoiesis in fetal liver resulting from inactivation of the EKLF gene. *Nature* 375, 316-322.

Ozcelik,T., Porteus,M.H., Rubenstein,J.L., and Francke,U. (1992) DLX2 (TES1), a homeobox gene of the distal-less family, assigned to conserved regions on human and mouse chromosomes 2. *Genomics* 13, 1157-1161.

Palis,J., Robertson,S., Kennedy,M., Wall,C., and Keller,G. (1999). Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development* 126, 5073-5084.



Panganiban,G. and Rubenstein,J.L. (2002). Developmental functions of the Distal-less/Dlx homeobox genes. *Development* 129, 4371-4386.

Park,G.T., Denning,M.F., and Morasso,M. (2001). Phosphorylation of murine homeodomain protein Dlx3 by protein kinase C. *FEBS lett.* 496, 60-65.

Passner,J.M., Ryoo,H.D., Shen,L., Mann,R.S., and Aggarwal,A.K. (1999). Structure of a DNA-bound Ultrabithorax-Extradenticle homeodomain complex. *Nature* 397, 714-719.

Perkins,A.C., Sharpe,A.H., and Orkin,S.H. (1995). Lethal beta-thalassaemia in mice lacking the erythroid CACCC-transcription factor EKLF. *Nature* 375, 318-322.

Perkins,A.C., Gaensler,K.M., and Orkin,S.H. (1996). Silencing of human fetal globin expression is impaired in the absence of the adult beta-globin gene activator protein EKLF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 12267-12271.

Perkins,A.C. (1999). Erythroid kruppel like factor : from fishing expedition to gourmet meal. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31, 1175-1192.

Peterson,K.R., Clegg,C.H., Huxley,C., Josephson,B.M., Haugen,H.S., Furukawa,T., and Stamatoyannopoulos,G. (1993). Transgenic mice containing a 248Kb yeast artificial chromosome carrying the  $\beta$ -globin locus display proper developmental control of human globin genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 7593-7597.

Peterson,K.R., Li Liang,Q., Clegg,C.H., Huxley,C., Furukawa,T., Navas,P.A., Norton,E.J., Kimbrough,T.G., and Stamatoyannopoulos,G. (1995). Use of yeast artificial chromosome (YACs) in studies of mammalian development : Production of  $\beta$ -globin locus YAC mice carrying human globin developmental mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 5655-5659.

Peterson,K.R., Harju,S., Navas,P.A., and Stamatoyannopoulos,G. Role of  $\gamma$ -globin gene silencing and chromatin sub-domains in globin gene switching. Communication orale, The thirteenth conference on hemoglobin switching, St. John's College, Oxford, UK, 26-30 septembre 2002.

Pevny,L., Lin,C.S., D'Agati,V., Simon,M.C., Orkin,S.H., and Costantini,F. (1995). Development of hematopoietic cells lacking transcription factor GATA-1. *Development* 121, 163-172.

Pevny,L., Simon,M.C., Robertson,E., Klein,W.H., Tsai,S.F., D'Agati,V., Orkin,S.H., and Costantini,F. (1991). Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* 349, 257-260.

Phelan,M.L., Rambaldi,I., and Featherstone,M.S. (1995). Cooperative interactions between HOX and PBX proteins mediated by a conserved peptide motif. *Mol. Cell Biol.* 15, 3989-3997.

Piper,D.E., Batchelor,A.H., Chang,C.-P., Cleary,M.L., and Wolberger,C. (1999). Structure of a HoxB1-Pbx1 heterodimer bound to DNA : Role of the hexapeptide and a fourth homeodomain helix in complex formation. *Cell* 96, 587-597.

Plumb,M., Frampton,J., Wainwright,H., Walker,M., Macleod,K., Goodwin,G., and Harrison,P. (1989). GATAAG : A cis-control region binding an erythroid-specific nuclear factor with a role in globin and non-globin gene expression. *Nucleic Acids Res.* 17, 73-92.

Porcu,S., Kitamura,M., Witkowska,E., Zhang,Z., Mutero,A., Lin,C., Chang,J., and Gaensler,K.M.L. (1997). The human  $\beta$ -globin locus introduced by YAC transfer exhibits a specific and reproducible pattern of developmental regulation in transgenic mice. *Blood* 90, 4602-4609.

Price,M., Lemaistre,M., Pischetola,M., di Lauro,R., and Duboule,D. (1991). A mouse gene related to *Distal-less* shows a restricted expression in the developing forebrain. *Nature* 351, 748-751.

Raich,N., Enver,T., Nakamoto,B., Josephson,B., Papayannopoulou,T., and Stamatoyannopoulos,G. (1990). Autonomous developmental control of human embryonic globin gene switching in transgenic mice. *Science* 250, 1147-1149.

Raich,N., Papayannopoulou,T., Stamatoyannopoulos,G., and Enver,T. (1992). Demonstration of a human  $\epsilon$ -globin gene silencer with studies in transgenic mice. *Blood* 79, 861-864.

Raich,N., Clegg,C.H., Grofti,J., Roméo,P.-H., and Stamatoyannopoulos,G. (1995). GATA1 and YY1 are developmental repressors of the human  $\epsilon$ -globin gene. *EMBO J.* 14, 801-809.

Reitman,M., and Felsenfeld,G. (1988). Mutational analysis of the chicken  $\beta$ -globin enhancer reveals two positive-acting domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85, 6267-6271.

Roberson,M.S., Meermann,S., Morasso,M.I., Mulvaney-Musa,J.M., and Zhang,T. (2001). A role for the homeobox protein Distal-less 3 in the activation of the glycoprotein alpha subunit gene in choriocarcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 276, 10016-10024.

Robertson,S., Kennedy,M., and Keller,G. (1999). Hematopoietic commitment during embryogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 872, 9-15.

Robinson,G.W., Wray,S., and Mahon,K.A. (1991). Spatially restricted expression of a member of a new family of murine *Distal-less* homeobox genes in the developing forebrain. *The new Biologist* 3, 1183-1194.

Roméo,P.-H., Prandini,M.-H., Joulin,V., Mignotte,V., Prenant,M., Vainchenker,W., Marguerie,G., and Uzan,G. (1990). Megacaryocytic and erythrocytic lineages share specific transcription factors. *Nature* 344, 447-449.

Ryoo,H.M., Hoffmann,H.M., Beumer,T., Frenkel,B., Towler,D.A., Stein,G.S., Stein,J.L., van Wijnen,A.J., and Lian,J.B. (1997). Stage-specific expression of *Dlx-5* during osteoblast differentiation : involvement in regulation of osteocalcin gene expression. *Mol. Endocrinol.* 11, 1681-1694.

Sabin,F.R.. (1920). Studies on the origin of blood vessels and of red corpuscles as seen in the living blastoderm of the chick during the second day of incubation. *Contributions to Embryology* 9, 213-262.

Schubeler,D., Francastel,C., Cimborá,D.M., Reik,A., Martin,D.I., and Groudine,M. (2000). Nuclear localization and histone acetylation: a pathway for chromatin opening and transcriptional activation of the human beta-globin locus. *Genes Dev.* 14, 940-950.

Sengupta,P.K., Lavelle,D.E., and DeSimone,J. (1994). The 87-kD A $\gamma$ -globin enhancer-binding protein is a product of the HOXB2 (HOX2H) locus. *Blood* 83, 1420-1427.

Shen,W.F., Detmer,K., Mathews,K., Hack,H.E., Morgan,F.M., Largman,D.A., and Lawrence,H.J. (1992). Modulation of homeobox gene expression alters the phenotype of human hematopoietic cell lines. *EMBO J.* 11, 983-989.

Shimamoto,T., Nakamura,S., Bollekens,J., Ruddle,F.H., and Takeshita,K. (1997). Inhibition of *DLX-7* homeobox gene causes decreased expression of *GATA-1* and *c-myc* genes and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 3245-3249.

Shimamoto,T., Ohyashiki,K., and Takeshita,K. (2000). Overexpression of the homeobox gene *DLX-7* inhibits apoptosis by induced expression of intracellular adhesion molecule-1. *Exp. Hemat.* 28, 433-441.

Shivdasani,R.A., Fujiwara,Y., McDevitt,M.A., and Orkin,S.H. (1997). A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor *GATA-1* in megakaryocyte growth and platelet development. *EMBO J.* 16, 3965-3973.

Simeone,A., Acampora,D., Pannese,M., D'Esposito,M., Stornaiuolo,A., Gulisano,M., Mallamaci,A., Kastury,K., Druck,T., Huebner,K., and Boncinelli,E. (1994). Cloning and characterization of two members of the vertebrate *Dlx* gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 2250-2254.

Siminovitch,L., McCulloch,E.A., and Till,J.E. (1963). The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *J. Cell. Comp. Physiol.* 62, 327-336.

Simon,M.C. (1993). Transcription factor GATA-1 and erythroid development. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 202, 115-121.

Simon,M.C., Pevny,L., Wiles,M.V., Keller,G., Costantini,F., and Orkin,S.H. (1992). Rescue of erythroid development in gene targeted GATA-1- mouse embryonic stem cells. *Nat. Genet.* 1, 92-98.

Sposi,N.M., Zon,L.I., Care,A., Valtieri,M., Testa,U., Gabbianelli,M., Mariani,G., Bottero,L., Mather,C., Orkin,S.H., and . (1992). Cell cycle-dependent initiation and lineage-dependent abrogation of GATA-1 expression in pure differentiating hematopoietic progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 6353-6357.

Stamatoyannopoulos,G., Josephson,B., Zhang,J.-W., and Li,Q. (1993). Developmental regulation of human  $\gamma$ -globin genes in transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.* 13, 7636-7644.

Stock,D.W., Ellis,D.L., Zhao,Z., Ekker,M., Ruddle,F.R., and Weiss,K.M. (1996). The evolution of the vertebrate *Dlx* gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 10858-10863.

Strouboulis,J., Dillon,N., and Grosveld,F. (1992). Developmental regulation of a complete 70-Kb human  $\beta$ -globin locus in transgenic mice. *Genes Dev.* 6, 1857-1864.

Sutherland,H.J., Eaves,C.J., Eaves,A.C. (1989). Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis *in vitro*. *Blood* 74, 1563-1570.

Sutherland,H.J., Lansdorp,P.M., Henkelman,D.H. (1990). Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal layers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 3584-3588.

Szilvassy,S.J., Humphries,R.K., Lansdorp,P.M., Eaves,A.C., and Eaves,C.J. (1990). Quantitative assay for totipotent reconstituting hematopoietic stem cells by a competitive repopulation strategy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 8736-8740.

Talbot,D., Collis,P., Antoniou,M., Vidal,M., Grosveld,F., and Greaves,D.R. (1989). A dominant control region from the human  $\beta$ -globin locus conferring integrations site independent gene expression. *Nature* 338, 352-355.

Tanabe,O., Katsuoka,F., Campbell,A.D., Song,W., Yamamoto,M., Tanimoto,K., and Engel,J.D. (2002). An embryonic/fetal beta-type globin gene repressor contains a nuclear receptor TR2/TR4 heterodimer. *EMBO J.* 21, 3434-3442.

Tanaka,M., and Herr,W. (1990). Differential transcriptional activation by Oct-1 and Oct-2 : interdependent activation domains induce Oct-2 phosphorylation. *Cell* 60, 375-386.

Tanimoto,K., Liu,Q., Bungert,J., and Engel,J.D. (1999). Effects of altered gene order or orientation of the locus control region on human  $\beta$ -globin gene expression in mice. *Nature* 398, 344-348.

Tanimoto,K., Liu,Q., Grosveld,F., Bungert,J., and Engel,J.D. (2000). Context-dependent EKLF responsiveness defines the developmental specificity of the human epsilon-globin gene in erythroid cells of YAC transgenic mice. *Genes Dev.* 14, 2778-2794.

Till,J.E., and McCulloch,E.A. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Rad. Res.* 14, 213-222.

Townes,T.M., Lingrel,J.B., Chen,H.Y., Brinster,R.L., and Palmiter,R.D. (1985). Erythroid-specific expression of human  $\beta$ -globin genes in transgenic mice. *EMBO J.* 4, 1715-1723.

Trudel,M., and Constantini,F. (1987). A 3' enhancer contributes to the stage-specific expression of the human  $\beta$ -globin gene. *Genes Dev.* 1, 954-961.

Tsai,S.-F., Martin,D.I., Zon,L.I., D'Andrea,A.D., Wong,G.G., and Orkin,S.H. (1989). Cloning of cDNA for the major DNA-binding protein of the erythroid lineage through expression in mammalian cells. *Nature* 339, 446-451.

Tsang,A.P., Fujiwara,Y., Hom,D.B., and Orkin,S.H. (1998). Failure of megakaryopoiesis and arrested erythropoiesis in mice lacking the GATA-1 transcriptional cofactor FOG. *Genes Dev.* 12, 1176-1188.

Tsang,A.P., Visvader,J.E., Turner,C.A., Fujiwara,Y., Yu,C., Weiss,M.J., Crossley,M., and Orkin,S.H. (1997). FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell* 90, 109-119.

Tuan,D., Solomon,D., Li,Q. and London,I.M. (1985). The «  $\beta$ -like globin » gene domain in human erythroid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 82, 6383-6388.

Vieille-GrosJean,I., Roullot,V., and Courtois,G. (1992a). Lineage and stage specific expression of HOX 1 genes in the human hematopoietic system. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 183, 1124-1130.

Vieille-GrosJean,I., Roullot,V., and Courtois,G. (1992b). Identification of homeobox-containing genes expressed in hematopoietic blast cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 185, 785-792.

Wagner,R.C. (1980). Endothelial cell embryology and growth. *Adv. Microcirc.* 9, 45-75.

Wall,L., deBoer,E., and Grosveld,F. (1988). The human  $\beta$ -globin gene 3'enhancer contains multiple binding sites for an erythroid-specific protein. *Genes Dev.* 2, 1089-1100.

Weiss,M.J., Keller,G., and Orkin,S.H. (1994). Novel insights into erythroid development revealed through *in vitro* differentiation of GATA-1 embryonic stem cells. *Genes Dev.* 8, 1184-1197.

Weiss,M.J. and Orkin,S.H. (1995). Transcription factor GATA-1 permits survival and maturation of erythroid precursors by preventing apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 9623-9627.

Whitelaw,E., Tsai,S.F., Hogben,P., and Orkin,S.H. (1990). Regulated expression of globin chains and the erythroid transcription factor GATA-1 during erythropoiesis in the developing mouse. *Mol. Cell Biol.* 10, 6596-6606.

Wijgerde,M., Gribnau,J., Trimborn,T., Nuez,B., Philipsen,S., Grosveld,F., and Fraser,P. (1996). The role of EKLF in human  $\beta$ -globin gene competition. *Genes Dev.* 10, 2894-2902.

Wiles,M.V. and Keller,G. (1991). Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture. *Development* 111, 259-267.

Wilson,D.B., Dorfman,D.M., and Orkin,S.H. (1990). A non-erythroid GATA-binding protein is required for function of the human preproendothelin-1 promoter in endothelial cells. *Mol. Cell. Biol.* 10, 4854-4862.

Wong,P.M.C., Chung,S., White,J.S., Reicheld,S.M., Paterson,M., Clarke,B.J., and Chui,D.H.K. (1983). Adult hemoglobins are synthesized in murine fetal hepatic erythropoietic cells. *Blood* 62, 1280-1288.

Wong,P.M.C., Chung,S.W., Chui,D.H.K., and Eaves,C.J. (1986). Properties of the earliest clonogenic hematopoietic precursors to appear in the developing murine yolk sac. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 83, 3851-3854.

Woods,W.G. (1982). Erythropoiesis and haemoglobin production during development. *In* C.T. Jones (ed.). *Biochemical development of the fetus and neonate*. Elsevier Biomedical Press. New York, 127-162.

Worton,R.G., McCulloch,E.A., and Till,J.E. (1969). Physical separation of hemopoietic stem cells from cells forming colonies in culture. *J. Cell. Physiol.* 74, 171-182.

- Xiao,S., McCarthy,J.G., Aster,J.C., and Fletcher,J.A. (2000). ZNF198-FGFR1 transforming activity depends on a novel proline-rich ZNF198 oligomerization domain. *Blood* 96, 699-704.
- Xu,S.C., Harris,M.A., Rubenstein,J.L., Mundy,G.R., and Harris,S.E. (2001). Bone morphogenetic protein-2 (bmp-2) signaling to the *col2alpha1* gene in chondroblasts requires the homeobox gene *dlx-2*. *DNA Cell Biol.* 20, 359-365.
- Yamamoto,M., Ko,L.J., Leonard,M.W., Beug,H., Orkin,S.H., and Engel,J.D. (1990). Activity and tissue-specific expression of the transcription factor NF-E1 multigene family. *Genes Dev.* 4, 1650-1662.
- Yang,L., Zhang,H., Hu,G., Wang,H., Abate-Shen,C., and Shen,M.M. (1998). An early phase of embryonic *Dlx5* expression defines the rostral boundary of the neural plate. *J. Neurosci.* 18, 8322-8330.
- Yomogida,K., Ohtani,H., Harigae,H., Ito,E., Nishimune,Y., Engel,J.D., and Yamamoto,M. (1994). Developmental stage- and spermatogenic cycle-specific expression of the transcription factor GATA-1 in mouse sertoli cells. *Development* 120, 1759-1766.
- Yousoufian,H., Zon,L., Orkin,S.H., D'Andrea,A.D., and Lodish,H.F. (1990). Genomic structure and transcription of the mouse erythropoietin receptor gene. *Mol. Cell. Biol.* 10, 3675-3682.
- Yu,G., Zerucha,T., Ekker,M., and Rubenstein,J.L.R. (2001). Evidence that GRIP, a PDZ-domain protein which is expressed in the embryonic forebrain, co-activates transcription with DLX homeodomain proteins. *Dev. Brain Res.* 130, 217-230.
- Zerucha,T., Stuhmer,T., Hatch,G., Park,B.K., Long, Q., Yu, G., Gambarotta,A., Schultz,J.R., Rubenstein,J.L., and Ekker,M. (2000). A highly conserved enhancer in the *Dlx5/Dlx6* intergenic region is the site of cross-regulatory interactions between *Dlx* genes in the embryonic forebrain. *J. Neurosci.* 20, 709-721.
- Zhang,H., Hu,G., Wang,H., Sciavolino,P., Iler,N., Shen,M.M., and Abate-Shen,C. (1997). Heterodimerization of *Msx* and *Dlx* proteins results in functional antagonism. *Mol. Cell Biol.* 17, 2920-2932.
- Zhou,W., Clouston,D.R., Wang,X., Cerruti,L., Cunningham,J.M., and Jane,S.M. (2000). Induction of human fetal globin gene expression by a novel erythroid factor, NF-E4. *Mol. Cell Biol.* 20, 7662-7672.
- Zon,L.I., Yousoufian,H., Mather,C., Lodish,H.F., and Orkin,S.H. (1991). Activation of the erythropoietin receptor promoter by transcription factor GATA-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 10638-10641.

